ELICITAÇÃO DA FITOALEXINA GLICEOLINA EM COTILÉDONES
DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL) POR POLISSACARÍDEOS
EXTRACELULARES DE UREDINIOSPOROS DE
Hemileia vastatrix BERK. ET BR.

SYLVIA DIAS GUZZO
Química

Orientador: Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1989

Guzzo, Sylvia Dias

G993e Elicitação da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja (Glycine max (L.) Merrill) por polissacarídeos extracelulares de uredíniosporos de Hemileia vastatrix Berk. et Br. Piracicaba, 1989.

152p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Fitoalexina - Elicitação 2. Fungo fitopatogênico - Bioquímica 3. Polissacarídeo extracelular fúngico - Atividade elicitora 4. Soja - Cotilédone - Alexina 5. Soja - Resistência à doença 6. Uredíniosporo - Elicitor extracelular I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba
CDD 633.34

ELICITAÇÃO DA FITOALEXINA GLICEOLINA EM COTILÉDONES
DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL) POR POLISSACARÍDEOS
EXTRACELULARES DE UREDINIOSPOROS DE
Hemileia vastatrix BERK. ET BR.

Sylvia Dias Guzzo

Aprovada em: 30/08/89

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Dr^a Walkyria Bueno de Camargo Moraes

Inst. Biol./São Paulo

Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes
Orientadora

ii.

Aos meus queridos pais,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos

À Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, Chefe da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pela orientação, sugestões, apoio e incentivo dispensados à realização deste trabalho.

Ao Dr. MÁRIO BARRETO FIGUEIREDO, Diretor da Divisão de Patologia Vegetal do Instituto Biológico e ao Professor Dr. DARCY MARTINS DA SILVA, do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela revisão dos originais.

Ao Dr. MANOEL MIRANDA, Chefe da Seção de Leguminosas do Instituto Agrônômico, pelo fornecimento de sementes de variedades de soja.

À ANA REGINA ROCHA TEIXEIRA, ao CELSO BEZERRA DE JESUS e ao MARCELO DE LUCCA FIGUEIREDO, funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica, pelo auxílio na coleta de uredíniosporos da ferrugem do cafeeiro.

À Srta. FLORINDA NAIDE MAGLIO e a Srta. SILVA NA D'AGOSTINI, da Seção de Desenho do Instituto Biológico, pela confecção dos gráficos.

À Sra. CECILIA ABEID TEIXEIRA, funcionária da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pelos trabalhos de datilografia.

Ao SERGIO VIANNA, da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico pelo auxílio prestado na confecção das fotos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a "Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit", GmbH (GTZ) pelo auxílio financeiro prestado.

Aos demais colegas e funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. Considerações gerais sobre fitoalexinas ...	06
2.2. Considerações sobre a natureza química e a especificidade dos elicitores de fitoalexinas	13
2.3. Mecanismo de ação dos elicitores e seu pa- pel nos mecanismos de resistência	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Fonte de material	30
3.1.1. Fungos	30
3.1.2. Planta	31
3.2. Obtenção dos elicitores	32
3.2.1. <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2.2. <i>H. vastatrix</i>	33
3.3. Bioensaio e seleção da variedade de soja em pregada para o mesmo	34
3.4. Determinação da atividade elicitora da sín- tese de gliceolina das frações provenientes de <i>H. vastatrix</i>	36

	Página
3.5. Purificação do elicitor de <i>H. vastatrix</i> ...	38
3.5.1. Precipitação etanólica fracionada ..	38
3.5.2. Cromatografia de afinidade em Conca- navalina-A Sepharose 4B	40
3.5.3. Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose	43
3.5.4. Filtração em Bio-Gel P-60	45
3.6. Comparação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes de <i>H. vastatrix</i>	48
3.7. Efeito da variação da concentração do elici- tor de <i>H. vastatrix</i> na atividade elicitora	49
3.8. Estudos sobre a natureza química do elici- tor de <i>H. vastatrix</i>	50
3.8.1. Testes químicos	50
3.8.2. Cromatografia em fase gasosa	52
3.8.2.1. Preparação das amostras pa- ra análise	52
3.8.2.1.1. Hidrólise dos polissacari- deos	52
3.8.2.1.2. Redução dos monossacari- deos liberados	53
3.8.2.1.3. Separação dos alditóis e ácidos aldônicos	54
3.8.2.1.4. Lactonização dos ácidos aldônicos	55
3.8.2.1.5. Redução das aldonolacto- nas a alditóis	56
3.8.2.1.6. Acetilação das amostras .	57
3.8.2.2. Preparo das colunas cromato- gráficas	58
3.8.2.3. Separação e análise das amos- tras	60

3.8.3. Tratamentos efetuados com o elicitor de <i>H. vastatrix</i>	62
3.8.3.1. Tratamento com metaperiodato de sódio	62
3.8.3.2. Tratamento com pronase	64
3.8.3.3. Tratamentos com glicosidases	66
3.8.3.3.1. Tratamento com α -manosidase	66
3.8.3.3.2. Tratamento com β -galactosidade	67
3.8.3.3.3. Tratamento com β -glucosidase	68
3.9. Análise estatística	70
4. RESULTADOS	71
4.1. Seleção da variedade de soja empregada para os bioensaios	71
4.2. Testes químicos efetuados com a preparação bruta de <i>H. vastatrix</i>	73
4.3. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina da preparação bruta de <i>H. vastatrix</i>	76
4.4. Purificação do elicitor de <i>H. vastatrix</i> ..	76
4.4.1. Testes químicos efetuados com as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de <i>H. vastatrix</i> com etanol	76
4.4.2. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da precipitação etanólica fracionada	78
4.4.3. Cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B	81

4.4.4. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da cromatografia em Concanavalina-A Sepharose 4B	83
4.4.5. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da cromatografia em Concanavalina-A Sepharose 4B	85
4.4.6. Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose	87
4.4.7. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da cromatografia em DEAE-celulose	89
4.4.8. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da cromatografia em DEAE - celulose	91
4.4.9. Filtração em Bio-Gel P-60	93
4.4.10. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da filtração em Bio-Gel P-60	96
4.4.11. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da filtração em Bio-Gel P-60	98
4.5. Comparação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes de <i>H. vastatrix</i>	98
4.6. Efeito da variação da concentração do elicitor de <i>H. vastatrix</i> na atividade elicitora .	101
4.7. Estudos sobre a natureza química do elicitor de <i>H. vastatrix</i>	103
4.7.1. Cromatografia em fase gasosa	103
4.7.2. Tratamentos efetuados com o elicitor de <i>H. vastatrix</i>	106

4.7.2.1. Tratamento com metaperiodato de sódio	106
4.7.2.2. Tratamento com pronase	108
4.7.2.3. Tratamento com α -manosidase	108
4.7.2.4. Tratamento com β -galactosidase	111
4.7.2.5. Tratamento com β -glucosidase	111
5. DISCUSSÃO	114
5.1. Purificação do elicitor extracelular de <i>H. vastatrix</i> e considerações sobre a sua natureza química	114
5.2. Inespecificidade do elicitor extracelular de <i>H. vastatrix</i>	129
6. CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Bioensaio com cotilédones de soja empregando-se a variedade IAC-8 e como elicitor a fração LEV-SD na preparação de <i>S. cerevisiae</i>	74
2	Cromatografia de afinidade da fração FEA-80 em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B	82
3	Cromatografia de troca aniônica da fração FEA-EI em coluna de DEAE-celulose ..	88
4	Determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i) eluídos da coluna de Bio-Gel P-60	94
5	Filtração da fração FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60	95
6	Bioensaios com cotilédones de soja efetuados com a variedade IAC-8 e diferentes concentrações da fração elicitora FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação FEA	102
7	Cromatogramas dos derivados alditóis acetatos dos carboidratos presentes na preparação bruta FEA e nas diferentes frações resultantes de sua purificação	105

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Bioensaios efetuados com cotilédones de soja empregando-se as variedades IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina e a fração elicitora LEV-SD da preparação de <i>S. cerevisiae</i>	72
02	Concentração de carboidratos e proteínas totais na preparação bruta de <i>H. vastatrix</i>	75
03	Efeito de diferentes concentrações da preparação bruta de <i>H. vastatrix</i> na atividade elicitora da síntese de glicolína em cotilédones de soja	77
04	Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de <i>H. vastatrix</i> com etanol	79
05	Bioensaios com cotilédones de soja e as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de <i>H. vastatrix</i> com etanol	80
06	Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B	84

TABELA Nº

Página

07	Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em Concana-valina-A Sepharose 4B	86
08	Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em coluna de DEAE-celulose .	90
09	Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em DEAE-celulose	92
10	Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60	97
11	Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da filtração da amostra FEA-A em Bio-Gel P-60	99
12	Atividades elicitoras relativas da síntese de gliceolina da preparação FEA de <i>H. vastatrix</i> e das frações subsequentes resultantes de sua purificação	100
13	Composição dos açúcares neutros da preparação elicitora bruta FEA de <i>H. vastatrix</i> e das frações subsequentes resultantes de sua purificação	104

TABELA Nº

Página

14	Efeito do tratamento com metaperiodato de sódio sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA através da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60 ..	107
15	Efeito do tratamento com pronase sobre a atividade elicitora da fração FEA-80, obtida pela precipitação etanólica fracionada da preparação FEA a 80%	109
16	Efeito do tratamento com α -manosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60	110
17	Efeito do tratamento com β -galactosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.	112
18	Efeito do tratamento com β -glucosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A _{285nm}	absorbância a 285 nanômetros
AE	atividade elicitora
AER	atividade elicitora relativa
ca.	cerca
cv.	cultivar
d.e.	diâmetro externo
DEAE-celulose	dietilaminoetil-celulose
EGA	etileno glicol adipato
EGS	etileno glicol succinato
Eq	equivalente
g	aceleração da gravidade
meq/g	miliequivalente por grama
nm	nanômetro
PAL	fenilalanina amonia-liase
PBS	tampão fosfato de sódio
Pmg	<i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>sojae</i> ou <i>Phytophthora</i> f.sp. <i>glycinea</i>
p/v	peso por volume
SAB	soro-albumina bovina
µm	micrômetro
UV	luz ultra violeta
Vi	volume interno da coluna de Bio-Gel P-60
Vo	volume externo da coluna de Bio-Gel P-60
vol/cm	volume por centímetro
v/v	volume por volume
LEV-SD	preparação elicitora de <i>S. cerevisiae</i>
FEA	filtrado de esporos autoclavados de <i>H. vastatrix</i>

LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS

PLANTAS

Nome Científico	Nome vulgar
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	plátano
<i>Avena sativa</i> L.	aveia
<i>Coffea arabica</i> L.	cafeeiro
<i>Daucus carota</i> L.	cenoura
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	soja
<i>Ipomoea batatas</i> Lam.	batata doce
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	tomateiro
<i>Oryza sativa</i> L.	arroz
<i>Petroselinum hortense</i> Hoffm.	salsa
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijoeiro
<i>Pisum sativum</i> L.	ervilha
<i>Prunus persicae</i> Batsch.	pessegueiro
<i>Ricinus communis</i> L.	mamona
<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	sorgo
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	trevo
<i>Trifolium procumbens</i> L.	trevo
<i>Vicia faba</i> L.	fava

MICROORGANISMOS

Aphanomyces euteiches Drechs.
Ceratocystis fimbriata (Ell. et Hals) Elliot
Cladosporium fulvum Cooke (= *Fulvia fulva* (Cooke) Cif.)
Colletotrichum destructivum O'Gara
Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. et Magn.) Scrib.
Colletotrichum trifolii Bain e Essary
Erwinia carotovora (Jones) Holl

Fusarium coeruleum Lib. ex Sacc.
Fusarium solani (Mart.) Sacc. f.sp. *pisi* (Jones) Snyder e Hansen
Helminthosporium maydis Nisik. e Miy.
Helminthosporium victoriae Meehan e Murphy
Hemileia vastatrix Berkeley et Broome
Monilinia fructicola (Wint.) Honey
Phytophthora infestans (Mont.) de Barry
Phytophthora megasperma Drechs. var. *sojae* A.A. Hildebrand
(= *Phytophthora megasperma* Drechs. f.sp. *glycinea* (Hildeb.)
Kuan e Erwin)
Puccinia coronata Cda. f.sp. *avenae* Fraser et Ledingham
Pyricularia oryzae Cav.
Rhizopus stolonifer (Fr.) Lind.
Saccharomyces cerevisiae Meyen
Uromyces phaseoli (Reb.) Wint. var. *typica* Arth.
Verticillium hemileiae Bouriquet (= *Verticillium lecanii* Zimm.)

ELICITAÇÃO DA FITOALEXINA GLICEOLINA EM COTILÉDONES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL) POR POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES DE UREDINIOSPOROS DE *Hemileia vastatrix* BERK. ET BR.

Autora: SYLVIA DIAS GUZZO

Orientador: Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

RESUMO

Com o objetivo de demonstrar a existência de substâncias extracelulares em urediniosporos de *Hemileia vastatrix*, capazes de desencadear a formação de fitoalexinas, foram utilizados bioensaios com cotilédones de soja. Para tanto foi inicialmente selecionada, através de bioensaios, a variedade de soja IAC-8, entre as variedades IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina, por ser a mais adequada quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e quanto à uniformidade de resposta em presença de um elicitor ativo nestes tecidos, proveniente de extrato comercial de células autolisadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Foi possível verificar que substâncias presentes no filtrado de suspensão aquosa de urediniosporos autoclavados de *H. vastatrix* são capazes de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, variedade IAC-8.

Objetivando o isolamento da substância elicitora extracelular, mais ativa, proveniente de urediniosporos

de *H. vastatrix*, o filtrado aquoso foi submetido à purificação através de precipitação etanólica fracionada, seguida de cromatografias em colunas de Concanavalina-A Sepharose 4B, DEAE-celulose e Bio-Gel P-60, sendo estas etapas intercaladas por diálise. Pôde-se verificar que a atividade elicitora relativa aumentou gradativamente durante o processo de purificação, sendo que a fração elicitora mais pura apresentou uma atividade relativa 16,7 vezes maior do que aquela detectada para o filtrado aquoso bruto. O elicitor extracelular mostrou-se ativo mesmo quando concentrações equivalentes a 0,92 µg de carboidratos foram aplicadas por cotilédone. A atividade elicitora aumentou quando foram utilizadas concentrações crescentes do elicitor purificado, atingindo um máximo à concentrações equivalentes a 10 µg de carboidratos por cotilédone.

Foi possível observar que o elicitor extracelular de *H. vastatrix*, solúvel em água e termoestável, é precipitado com etanol a 80% (v/v), não apresenta afinidade pela lectina Concanavalina-A e nem tampouco pelo trocador ani^onico dietilaminoetil-celulose e possui um peso molecular menor que 60.000 e maior que 6.000 daltons.

Visando elucidar a natureza química do elicitor extracelular de *H. vastatrix*, frações ativas foram submetidas a testes químicos para quantificação de carboidratos e proteínas, análise por cromatografia em fase gasosa e a tratamentos com metaperiodato de sódio e com as enzimas prona-

se, α -manosidase, β -galactosidase e β -glucosidase. O elicitor extracelular é oxidado pelo metaperiodato de sódio, o que acarreta a perda de sua atividade elicitora (94,63%), sendo esta parcialmente recuperada (56,20%) por redução com boro-hidreto de sódio e posterior hidrólise ácida fraca. Entretanto, a atividade elicitora não é alterada pelos tratamentos com as referidas enzimas. Os resultados obtidos evidenciam que o elicitor extracelular de *H. vastatrix* possui natureza polissacarídica, apresentando como principal componente a manose (88,77%), seguida pela glucose (6,67%) e a galactose (4,56%), sendo que os monossacarídeos componentes das moléculas dos polissacarídeos estão unidos entre si por ligações do tipo β .

O polissacarídeo extracelular isolado de uredíniosporos de *H. vastatrix* possui uma atividade biológica inespecífica, pois é capaz de desencadear a formação de fitoalexinas em uma planta não-hospedeira a *H. vastatrix* como a soja.

ELICITATION OF THE PHYTOALEXIN GLYCEOLLIN IN SOYBEAN
COTYLEDONS (*Glycine max* (L.) MERRILL) BY EXTRACELLULAR
POLYSACCHARIDES FROM UREDINIOSPORES OF *Hemileia vastatrix*
BERK. ET BR.

Author: SYLVIA DIAS GUZZO

Adviser: Dr. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

SUMMARY

In order to demonstrate the presence of extracellular substances from urediniospores of *Hemileia vastatrix*, able to elicit the accumulation of phytoalexins, bioassays on soybean cotyledons were employed. First of all, among the soybean cultivars IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 and Cristalina, the IAC-8 cultivar was selected through the cotyledon bioassay for further experiments, since it exhibited a more suitable and uniform response to an active glyceollin elicitor, isolated from a commercially available extract of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. It was possible to verify that substances present in the filtrate of water-washes from autoclaved urediniospores of *H. vastatrix* were able to stimulate the synthesis of the phytoalexin glyceollin in IAC-8 soybean cotyledons.

In order to isolate the extracellular elicitor from *H. vastatrix*, filtrates of water-washes of the autoclaved urediniospores, were purified through fractionated ethanolic

precipitation, followed by column chromatography on Concanavalin-A Sepharose 4B, DEAE-cellulose and Bio-Gel P-60, intercalated with dialysis. It was possible to verify that the relative elicitor activity gradually increased throughout the purification steps and that the purest elicitor fraction showed a relative elicitor activity 16.7 times greater than that exhibited by the crude filtrate. The purified extracellular elicitor was active even when concentrations equivalent to 0.92 μg of carbohydrate were applied per cotyledon. The elicitor activity increased with increasing amounts of elicitor up to approximately 10 μg of carbohydrates per cotyledon.

It was observed that the water-soluble extracellular elicitor from *H. vastatrix* was heat-stable, precipitated with 80% ethanol (v/v), had no affinity neither for the Concanavalin-A lectin nor for the anion exchanger diethylaminoethyl-cellulose. The elicitor showed a molecular weight lower than 60,000 and greater than 6,000 daltons.

In order to elucidate the chemical nature of the extracellular elicitor from *H. vastatrix*, active fractions were submitted to chemical tests, analysis through gas-liquid chromatography and treatments with sodium metaperiodate and also with pronase, α -mannosidase, β -galactosidase and β -glucosidase. The extracellular elicitor was sensitive to the sodium metaperiodate, that caused the elimination of its elicitor activity (94.63%). The biological activity was

partially regained (56.20%) when the periodate-degraded polymers were reduced with sodium borohydride, followed by a mild acid hydrolysis. However, the elicitor activity was not affected by the mentioned enzyme treatments. Yet, the results showed that the extracellular elicitor from *H. vastatrix* was a β -linked polysaccharide that presented mannose as the major component (88.77%), followed by glucose (6.67%) and galactose (4.56%).

The extracellular polysaccharide isolated from urediniospores of *H. vastatrix* showed an unspecific biological activity, due to its ability to elicit phytoalexin accumulation on a non-host plant to *H. vastatrix*, as the soybean.

1. INTRODUÇÃO

Na natureza, as plantas estão expostas ao ataque por inúmeros microorganismos sendo, no entanto, resistentes à grande maioria dos mesmos. A resistência de plantas à doenças depende de múltiplos mecanismos que incluem barreiras de defesa física e química pré-formadas, tais como a cutícula, as paredes celulares ou compostos antimicrobianos constitutivos, bem como um complexo de respostas de defesa que é desencadeado ou melhor, ativado pelo microorganismo invasor. Esses mecanismos de resistência efetivos, induzíveis, requerem a síntese de proteínas e a ativação de vias metabólicas. Entretanto, para que as respostas de defesa sejam desencadeadas é necessário que as plantas reconheçam primariamente os patógenos potenciais como organismos estranhos. Por outro lado, estes microorganismos fornecem sinais que, de alguma forma, ativam os mecanismos de resistência das plantas. Segundo AYERS et alii (1985), apesar destes mecanismos apresentarem grande complexidade, são surpreendentemente similares em relação aos diferentes patógenos. Assim, as plantas possuiriam um sistema de detecção muito flexível, o qual desen-

cadearia um complexo de respostas de defesa de efetividade bem ampla. De fato, vários autores (BUSHNELL & ROWELL, 1981; CALLOW et alii, 1987) propõem modelos que expressam a idéia de que as plantas são imunes ou resistentes à maioria dos patógenos através de sistemas gerais ou inespecíficos de reconhecimento.

Segundo KUC & CARUSO (1977) e HEITEFUSS (1982), não existe um único fator que determine a resistência ativa, mas sim diversos fatores interligados dentro de um sistema dinâmico. O acúmulo de fitoalexinas no sítio de infecção constitui um dos vários mecanismos de resistência ativos, utilizados pelas plantas para se defenderem de patógenos. As fitoalexinas tem sido definidas como compostos antimicrobianos de baixo peso molecular que são sintetizados e acumulados em plantas após a exposição a microorganismos (PAXTON, 1981).

Tem sido demonstrado que a síntese e o subsequente acúmulo de fitoalexinas em diferentes plantas hospedeiras podem ser desencadeados por substâncias extraídas da parede celular de microorganismos ou produzidas pelos mesmos quando cultivados "in vitro" (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984). Estas substâncias, denominadas de elicitores bióticos - "biotic elicitors" - (KEEN et alii, 1972; YOSHIKAWA, 1978), podem estar envolvidas nas interações de plantas e patógenos potenciais, possuindo um papel fisiológico importante. Estas moléculas se constituiriam em um sinal para as plantas iniciarem o processo de síntese de fitoalexinas (DARVILL & AL-

BERSHEIM, 1984). Diversas pesquisas tem sido realizadas visando a purificação e caracterização química de elicitores bióticos, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos de resistência das plantas a patógenos.

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, sintetiza caracteristicamente uma fitoalexina pterocarpanóide, designada gliceolina, em resposta à infecção pelo patógeno *Phytophthora megasperma* Drechs.f.sp. *glycinea* (Hildeb.) Kuan e Erwin, agente causal da podridão do caule e da raiz (BURDEN & BAILEY, 1975). Foi verificado ainda que a gliceolina se acumula nos tecidos de soja, também em resposta ao tratamento com polissacarídeos isolados de extrato comercial de células autolisadas de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, um não-patógeno (HAHN & ALBERSHEIM, 1978).

Glucanas isoladas de *P. megasperma* f.sp. *glycinea* e de *S. cerevisiae*, se mostraram ativas como elicitores de fitoalexinas em tecidos de outras plantas, além da soja, tais como caules de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (CLINE et alii, 1978), tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) (CLINE et alii, 1978) e células em suspensão de salsa (*Petroselinum hortense* Hoffm.) (TIETJEN et alii, 1983; KOMBRINK & HAHLBROCK, 1986). Estes resultados levam a crer, que estas substâncias são inespecíficas quanto a sua ação elicitora da síntese de fitoalexinas.

Por outro lado, GUZZO et alii (1987) verificaram que substâncias de natureza polissacarídica presentes em

filtrado aquoso de uredíniosporos autoclavados de *Hemileia vastatrix* Berkeley et Broome, agente causal da ferrugem alaranjada do cafeeiro, induzem proteção em cafeeiros suscetíveis (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) a uma subsequente inoculação com o patógeno. O fenômeno da indução de proteção apresenta como característica marcante a inespecificidade, pois diferentes microorganismos são capazes de induzir proteção em uma mesma planta, à uma subsequente inoculação com o patógeno. Alguns autores tem relacionado o fenômeno da indução de proteção com o acúmulo de fitoalexinas (CHAMBERLAIN & PAXTON, 1968; BELL & PRESLEY, 1969; HÜMME et alii, 1981). Assim, substâncias capazes de induzir resistência em plantas suscetíveis, poderiam também apresentar atividade elicitora da síntese de fitoalexinas. Estas substâncias, biologicamente ativas, poderiam ser responsáveis pela ativação de diferentes mecanismos de resistência de plantas a patógenos.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de:

1. Demonstrar a possível existência de substâncias extracelulares em uredíniosporos de *H. vastatrix*, capazes de elicitar a formação de fitoalexinas.
2. Purificar e estudar a natureza química da substância elicitora mais ativa.
3. Demonstrar a inespecificidade da substância

isolada de urediniosporos de *H. vastatrix* como elicitor de fitoalexinas em plantas não-hospedeiras a *H. vastatrix*, como a soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FITOALEXINAS

MÜLLER & BÖRGER (1940) foram os primeiros pesquisadores a formalizar o conceito de que as plantas sintetizavam substâncias de defesa em resposta à infecção por fitopatógenos. Estes autores realizaram várias experiências visando verificar se a reação de hipersensibilidade, que era desencadeada em cultivares de batata resistentes a uma determinada raça de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry, poderia afetar o desenvolvimento de uma raça do mesmo fungo normalmente virulenta àquele cultivar. Os autores verificaram que ocorria inibição da raça virulenta nos tecidos de batata onde havia sido previamente iniciada a reação de hipersensibilidade, e concluíram que a inibição era causada por um "princípio" de defesa originado na planta e produzido na reação de hipersensibilidade. Denominaram este "princípio" de fitoalexina. Os autores observaram, ainda, que tubérculos de batata que apresentavam reação de hipersensibilidade, inibiam o crescimento do parasita *Fusarium coeruleum* Lib. ex Sacc. e de alguns fungos saprófitas. Concluíram portanto,

que as fitoalexinas apresentavam um efeito inibidor inespecífico.

Os experimentos clássicos de MÜLLER & BÖRGER (1940) estimularam vasta pesquisa visando a detecção de fitoalexinas em outras culturas, bem como seu isolamento e caracterização química.

O isolamento e a identificação, especialmente de duas fitoalexinas, muito contribuíram para a compreensão do papel desses compostos nos mecanismos de resistência de plantas às doenças. Estas foram: a pisatina (CRUICKSHANK & PERRIN, 1960; PERRIN & BOTTOMLEY, 1962) e a faseolina (CRUICKSHANK & PERRIN, 1963a; PERRIN, 1964), sendo caracterizadas como pterocarpanos. A primeira era produzida em vagens de ervilha (*Pisum sativum* L.) e a segunda em vagens de feijoeiro, quando estas eram tratadas na face interna com exudatos da germinação de esporos de *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, agente causal da podridão parda dos frutos do pessegueiro (*Prunus persicae* Batsch.).

Entretanto, após as primeiras fitoalexinas terem sido isoladas e identificadas, permaneciam as possibilidades destes compostos antifúngicos serem produtos dos próprios fungos ou do metabolismo conjunto dos fungos e dos seus hospedeiros. CRUICKSHANK & PERRIN (1963b) descartaram estas possibilidades, pois mostraram que a formação de pisatina era estimulada não apenas por exudatos da germinação de *M. fructicola*, mas também por soluções de cloreto de mercúrio ou de

cobre. Assim, esses autores consideraram a pisatina e a faseolina como produtos do hospedeiro e fitoalexinas no conceito geral concebido por MÜLLER & BÖRGER (1940).

A identificação das fitoalexinas pisatina e faseolina levou à investigação da produção de fitoalexinas em outras leguminosas. SIMS et alii (1972) observaram que a soja sintetizava uma fitoalexina pterocarpanóide muito relacionada quimicamente à faseolina e a designaram por hidroxifaseolina. BURDEN & BAILEY (1975), entretanto, consideraram a estrutura desta fitoalexina incorreta. Esses autores propuseram uma estrutura revisada da mesma, a qual passou a ser denominada de gliceolina (gliceolina I). Vários pesquisadores observaram que a gliceolina se acumulava em grandes quantidades em tecidos de soja, em resposta à infecção por *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* A.A. Hildebrand (= *Phytophthora megasperma* Drechs.f.sp. *glycinea* (Hildeb.) Kuan e Erwin), bem como em resposta à inoculação com vários microorganismos não-patogênicos (ALBERSHEIM & VALENT, 1978). No presente trabalho, a abreviação Pmg será utilizada para designar tanto *P. megasperma* f.sp. *glycinea* como a sua sinônima *P. megasperma* var. *sojae*, independentemente de como este fungo tenha sido citado pelos autores. LYNE et alii (1976) e LYNE & MULHEIRN (1978) isolaram de tecidos de soja infectados, dois isômeros da gliceolina I, os quais foram designados por gliceolina II e III. Posteriormente, WEINSTEIN et alii (1981) isolaram de tecidos de soja inoculados

com *Erwinia carotovora* (Jones) Holl, outra fitoalexina pterocarpanóide, a qual foi denominada de glicinol. Estas fitoalexinas pterocarpanóides mostraram-se potentes inibidores do crescimento de um amplo espectro de microorganismos (ALBERSHEIM & VALENT, 1978; WEINSTEIN et alii, 1981).

Segundo EBEL (1986), já foram caracterizadas cerca de 150 fitoalexinas, pertencendo a grupos químicos distintos, tais como isoflavonóides, sesquiterpenos, diterpenos, poliacetilenos, dihidrofenantrenos, estilbenos e outras classes de compostos, estando distribuídas em pelo menos 16 famílias de plantas, principalmente entre as dicotiledôneas. Assim, por exemplo, o composto sesquiterpenóide ipomeamarona foi isolado de raízes de batata doce (*Ipomoea batatas* Lam.) infectadas por *Ceratocystis fimbriata* (Ell. et Hals) Elliot (KUBOTA & MATSUURA, 1953); a metoximeleina, uma isocumarina substituída, isolada de raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) infectadas por *C. fimbriata* (CONDON & KUC, 1962); a rishitina, um sesquiterpeno, isolada de tecidos de batata (KATSUI et alii, 1968) e de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (SATO et alii, 1968) infectados por *P. infestans*; o composto terpenóide fituberina (VARNS et alii, 1971) isolado de tubérculos de batata infectados por *P. infestans*; e o ácido wyerônico, um furanoacetileno, isolado de fava (*Vicia faba* L.) infectada por *Botrytis* sp. (LETCHER et alii, 1970).

Mais recentemente foram isoladas fitoalexinas

de algumas gramíneas, tais como as momilactonas do arroz (*Oryza sativa* L.) após a infecção por *Pyricularia oryzae* Cav. (CARTWRIGHT et alii, 1981); as avenaluminas, de aveia (*Avena sativa* L.) infectada com *Puccinia coronata* Cda.f.sp. *avenae* Fraser et Ledingham (MAYAMA et alii, 1981) e as antocianidinas apiginidina e luteolinidina, em mesocótilos e folhas jovens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) inoculados com *Helminthosporium maydis* Nisik. e Miy. (NICHOLSON et alii, 1987; NICHOLSON et alii, 1988).

Após a descoberta das fitoalexinas, muitas pesquisas foram desenvolvidas visando esclarecer o papel destes compostos na resistência de plantas às doenças. O fato das fitoalexinas apresentarem características antibióticas e estarem ausentes em plantas sadias, ou presentes em concentrações muito pequenas, sendo acumuladas em muitas plantas no sítio de infecção após a exposição a microorganismos, sugeriu que estes compostos desempenhavam, nas plantas, uma função de defesa a fitopatógenos. Entretanto, verificou-se que as fitoalexinas eram também acumuladas em tecidos vegetais após injúria provocada tanto por agentes químicos abióticos, tais como sais de metais pesados, ribonuclease autoclavada, detergentes, bem como por agentes físicos, tais como raios ultravioleta, congelamento, aquecimento, etc. (HARGREAVES, 1979; BAILEY, 1982). Estes tratamentos estavam sempre associados com a morte de algumas células no tecido vegetal tratado (BAILEY, 1982). Este fato levou alguns pesquisadores a

denominarem as fitoalexinas de compostos de estresse (STOESSL et alii, 1976), tendo sido sugerido que as mesmas se acumulavam em tecidos vegetais inoculados ou infectados, devido simplesmente à injúria provocada pelos fitopatógenos, não tendo um papel mais relevante na resistência de plantas às doenças (VANDERPLANK, 1978). Ainda, VANETTEN & PUEPPKE (1976) verificaram que o fungo *Aphanomyces euteiches* Drechs., altamente sensível aos efeitos antibióticos da pisatina "in vitro", colonizava rapidamente os tecidos de ervilha, seu hospedeiro, apesar desses acumularem altas concentrações de fitoalexina. Estas e outras discrepâncias aparentes, levaram vários pesquisadores a questionar o papel geral das fitoalexinas na resistência de plantas às doenças (PUEPPKE, 1978).

Todavia, vários estudos forneceram evidências consideráveis de que o acúmulo de fitoalexinas no sítio de infecção é um mecanismo de resistência efetivo utilizado pelas plantas para se defenderem de agentes fitopatogênicos (MANSFIELD et alii, 1974; TEGTMEIER & VANETTEN, 1982).

Uma doença que recebeu considerável atenção como modelo para o estudo do papel das fitoalexinas, como fator de defesa, foi a podridão do caule e da raiz da soja causada por *P. megasperma* f.sp. *glycinea* (MANSFIELD, 1982). HAHN et alii (1985) examinaram detalhadamente a localização quantitativa de gliceolina em relação a hifa de *Pmg*, em microsecções de raízes de soja infectadas por seus zoosporos. Utilizaram um radioimunoensaio específico para detectar a gliceolina I e um corante imunofluorescente para a hifa do

fungo. Assim, foi possível demonstrar que, na interação incompatível, o crescimento do fungo limitado à vizinhança imediata do sítio de inoculação, estava associado com uma reação típica de hipersensibilidade e com o acúmulo de gliceolina I. De fato, esta fitoalexina se acumulou em concentrações tóxicas nos tecidos de soja, somente nos sítios de infecção, 5h após a inoculação. Contrastantemente, na interação compatível, o crescimento do fungo não era inibido, não ocorrendo qualquer acúmulo da fitoalexina nas primeiras horas de infecção. BONHOFF et alii (1986) demonstraram, ainda, que ocorria, nas interações incompatíveis, um aumento significativo na atividade de várias enzimas envolvidas na biossíntese de gliceolina, concomitantemente com o acúmulo de gliceolina I. Na interação compatível não foi observada qualquer mudança na atividade dessas enzimas. Estudos preliminares desenvolvidos por outros pesquisadores haviam também demonstrado que o acúmulo de fitoalexinas restrito aos sítios de infecção, precedia a interrupção do crescimento do fungo em hipocótilos de soja resistentes a uma raça avirulenta de *Pmg*. Nos cultivares suscetíveis, ocorria acúmulo de fitoalexinas a níveis tóxicos somente 24h após a inoculação, sendo que a gliceolina era detectada apenas nas camadas de tecido mais superficiais, estando ausente nos tecidos onde o fungo estava se desenvolvendo (YOSHIKAWA et alii, 1978). MOESTA & GRISEBACH (1982) demonstraram ainda, que a inibição "in situ" da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) pela adição

do ácido L-2-aminooxi-3-fenilpropionico, suprimiu o acúmulo da gliceolina em soja e levou à perda de resistência deste cultivar a uma raça normalmente avirulenta de *Pmg*.

2.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A NATUREZA QUÍMICA E A ESPECIFICIDADE DOS ELICITORES DE FITOALEXINAS

A descoberta das fitoalexinas levou à pesquisas visando o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelo início da biossíntese e subsequente acúmulo destas substâncias em tecidos vegetais. Foi verificado que filtrados de cultura e extratos de paredes de micélio de fungos estimulavam a formação de fitoalexinas. CRUICKSHANK & PERRIN (1968) denominaram estes materiais de **indutores** ("inducers"), sendo este termo posteriormente modificado para **elicitores** ("elicitors"), por KEEN et alii (1972). Desde então, o termo elicitor tem sido utilizado para se referir à substâncias capazes de induzir a síntese de fitoalexinas em plantas. YOSHIKAWA (1978) sugeriu que fosse feita uma divisão dos elicitores em **elicitores bióticos**, para designar compostos de origem biológica e portanto provenientes de microorganismos ou da própria planta, e **elicitores abióticos**, para os agentes de natureza física ou química, de origem não-biológica.

CRUICKSHANK & PERRIN (1968) foram os primeiros pesquisadores que isolaram, purificaram e caracterizaram par

cialmente um elicitor biótico. O elicitor foi extraído do micélio de *M. fructicola*, sendo denominado de monilicolina A. Os autores verificaram que esta substância era um peptídeo de peso molecular pequeno (8×10^3 daltons), capaz de ativar a síntese de faseolina quando aplicada na cavidade interna de vagens de feijoeiro (cv. "Red Kidney"). O elicitor era ativo a concentrações de 2×10^{-7} M (2 ppm). Entretanto, monilicolina A não foi capaz de estimular a síntese de fitoalexinas em tecidos de ervilha e de fava.

Até 1971, outros pesquisadores relataram a existência de elicitores produzidos por fitopatógenos, porém, a atividade elicitora destes era detectada utilizando-se preparações brutas dos mesmos. Nenhuma tentativa foi feita visando a purificação e caracterização química dessas substâncias (KLARMAN & GERDEMANN, 1963; RATHMELL & BENDALL, 1971).

KEEN et alii (1972) detectaram substâncias presentes no meio extracelular de cultura do fungo *Pmg*, com atividade elicitora. A aplicação do meio de cultura extracelular em hipocótilos ou cotilédones de soja, resultava na síntese e subsequente acúmulo da fitoalexina gliceolina nestes tecidos. O elicitor, parcialmente purificado, possuía um peso molecular pequeno e parecia ser um peptídeo.

AYERS et alii (1976c) purificaram elicitores isolados de filtrados de cultura de três raças de *Pmg*. Os elicitores obtidos das raças 1, 2 e 3 deste fungo apresenta-

vam a mesma habilidade em elicitar o acúmulo de gliceolina tanto em cotilédones como em hipocótilos do cultivar de soja "Harosoy 63", resistente às raças 1 e 2, mas suscetível à raça 3. Os autores verificaram que a substância ativa era uma glucana ramificada, apresentando predominantemente ligações $1 \rightarrow 3$.

AYERS et alii (1976a) extraíram da parede do micélio das raças 1, 2 e 3 de *Pmg*, elicitores da síntese de gliceolina em cotilédones e hipocótilos de soja cv. "Harosoy 63". Os elicitores foram purificados e caracterizados quimicamente. Foram obtidas quatro frações para cada raça de *Pmg*, durante o processo de purificação. As frações correspondentes provenientes de cada uma das três raças do fungo eram muito similares quanto à composição química e atividade elicitora. As frações mais ativas, obtidas para as três raças de *Pmg*, eram constituídas predominantemente de glucanas ramificadas apresentando principalmente ligações $1 \rightarrow 3$. Estes elicitores extraídos do micélio de *Pmg* eram similares quanto à composição química aos elicitores extracelulares obtidos do mesmo fungo descritos anteriormente (AYERS et alii, 1976c). Foi verificado, ainda, que a taxa de acúmulo de gliceolina era essencialmente a mesma em hipocótilos de soja cv. "Harosoy 63" tratados com os elicitores ou com o micélio vivo proveniente das raças de *Pmg* virulentas ou avirulentas àquele cultivar. Os autores observaram, também, que a fração elicitora mais ativa foi capaz de proteger hi-

pocótilos de soja cv. "Harosoy 63" da infecção pela raça 3 de *Pmg*, normalmente virulenta a esse cultivar, quando aplicada 10h antes da inoculação com o patógeno. Entretanto, quando o elicitor foi aplicado simultaneamente com a raça virulenta de *Pmg*, não se mostrou capaz de interromper o crescimento do fungo em hipocótilos de soja cv. "Harosoy 63".

AYERS et alii (1976b) apresentaram evidências de que os resíduos glicosil terminais da glucana de *Pmg* eram requeridos para a atividade elicitora. Além disso, foi demonstrado que 90% da glucana podia ser removida enzimaticamente com uma β -1,3-exoglucanase, sem resultar em qualquer perda de sua atividade elicitora. O resíduo resultante da digestão enzimática, o qual possuía ainda atividade elicitora, era uma glucana altamente ramificada apresentando ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(3 $\rightarrow$ 6) e contendo cerca de 4% de resíduos manosil. Foi estimado para o resíduo um peso molecular médio de cerca de 10.000 daltons. O elicitor ativo, não tratado enzimaticamente, se mostrou muito heterogêneo em tamanho apresentando um peso molecular médio oscilando de 1.000 a mais de 100.000 daltons.

EBEL et alii (1976) verificaram que os elicitores glucana isolados previamente das paredes do micélio das raças 1, 2 e 3 de *Pmg*, estimulavam igualmente a atividade da enzima PAL em cultura de células em suspensão de soja, salsa e plátano (*Acer pseudoplatanus* L.). Estes elicitores estimulavam, também, igualmente o acúmulo de gliceolina em cul-

tura de suspensão de células de soja do cv. "Harosoy", suscetível às três raças, e do cv. "Harosoy 63", resistente às raças 1 e 2, mas suscetível à raça 3.

Os resultados obtidos por AYERS et alii (1976a; 1976b; 1976c) e EBEL et alii (1976) indicavam claramente que os elicitores isolados de *Pmg* não eram raça-específicos. As três raças de *Pmg* se diferenciavam quanto à habilidade em infectar diferentes cultivares de soja. Entretanto, a atividade elicitora das glucanas isoladas destas raças e, consequentemente, o acúmulo de gliceolina não eram suficientes para explicar a interação específica existente no sistema soja-*Pmg*. Os autores afirmaram que a ação dos elicitores de *Pmg* não era raça - ou cultivar-específica e que a síntese de fitoalexinas fazia parte de um mecanismo geral de defesa das plantas.

HAHN & ALBERSHEIM (1978) isolaram e caracterizaram parcialmente um elicitor de extrato comercial da levedura *S. cerevisiae*, um não-patógeno de plantas. Esse elicitor estimulava o acúmulo de gliceolina em cotilédones e hipocótilos de soja, quando apenas 15 ou 100ng do mesmo eram aplicadas respectivamente nesses tecidos. O elicitor foi caracterizado como uma β -glucana, sendo muito similar quanto à composição química e à atividade elicitora àquele isolado do micélio de *Pmg*. Os autores sugeriram, também, que as plantas eram capazes de responder ativamente à presença de fungos sintetizando fitoalexinas, por reconhecerem polissacarí

deos estruturais ou extracelulares dos mesmos como substâncias estranhas.

Os resultados obtidos por CLINE et alii (1978) corroboravam esta idéia. Estes autores verificaram que as β -glucanas isoladas de *Pmg* e de *S. cerevisiae*, potentes elicitores do acúmulo de gliceolina em soja, estimulavam também a síntese de fitoalexinas em tecidos de feijoeiro e em tubérculos de batata.

Posteriormente, SHARP et alii (1984b) isolaram e purificaram da parede do micélio de *Pmg*, o menor oligossacarídeo que possuía ainda atividade elicitora da síntese de gliceolina em tecidos de soja. Foram obtidos oito isômeros hexa-(β -D-glucopiranosil)-D-glucitóis, sendo apenas um biologicamente ativo. As estruturas primárias dos oito hexa-(β -D-glucopiranosil)-D-glucitóis foram determinadas indicando que sete isômeros, incluindo o oligoglucosídeo ativo, consistiam de resíduos glucopiranosil ligados por ligações β -1 $\rightarrow$ 3, β -1 $\rightarrow$ 6 e β -3 $\rightarrow$ 6 e apresentavam estruturas muito similares (SHARP et alii, 1984a). A estrutura molecular do hepta- β -glucosídeo ativo como elicitor de gliceolina, foi confirmada por síntese química (OSSOWSKI et alii, 1984; SHARP et alii, 1984c). O hepta- β -glucosídeo sintetizado quimicamente possuía a mesma estrutura e a mesma atividade elicitora do fragmento isolado da parede do micélio de *Pmg*, sendo ambos ativos a concentrações de 10^{-9} a 10^{-10} M (SHARP et alii, 1984c).

Os resultados apresentados por AYERS et alii (1976a, 1976b e 1976c) e EBEL et alii (1976) contrastavam com aqueles obtidos anteriormente por KEEN (1975), que verificou que filtrados de cultura das raças 1 e 2 de *Pmg*, continham elicitores específicos da síntese de gliceolina. Este autor observou que filtrados de cultura das raças 1 e 2 de *Pmg*, continham metabólitos os quais em bioensaios em hipocótilos de soja, elicítavam no cultivar resistente "Harosoy 63", níveis maiores de gliceolina do que no cultivar suscetível "Harosoy". Filtrados de cultura da raça 3, virulenta aos cultivares "Harosoy 63" e "Harosoy", estimulavam a formação dos mesmos níveis de gliceolina nos dois cultivares. KEEN (1975) concluiu então, que os resultados obtidos eram consistentes com a hipótese de que metabólitos de fitopatógenos poderiam induzir especificamente suscetibilidade ou resistência no hospedeiro, através de um efeito diferencial na biossíntese de fitoalexinas.

KEEN & LEGRAND (1980), em estudos posteriores, isolaram glicoproteínas das paredes do micélio de diferentes raças de *Pmg* e observaram que estas substâncias elicítavam especificamente a síntese de gliceolina em hipocótilos de cultivares de soja compatíveis e incompatíveis a essas raças. Os autores obtiveram evidências de que a porção de carboidrato, composta de glucana e manana, das glicoproteínas era essencial para a atividade elicitora de gliceolina.

KEEN & YOSHIKAWA (1983) isolaram glucomanas da parede micelial de *Pmg* após o tratamento da mesma com a en

zima β -1,3-glucanase presente na soja. Estas glucomananas eram muito ativas como elicitores de gliceolina em cotilédones de soja e apresentavam raça-especificidade. Os autores afirmaram que estes resultados corroboravam a hipótese formulada por KEEN (1975), de que a existência de elicitores raça-específicos poderia explicar satisfatoriamente a interação específica existente entre soja e *Pmg*.

Além dos elicitores isolados de *Pmg*, outras substâncias com atividade elicitora obtidas de outros fungos, foram purificadas e caracterizadas quimicamente.

ANDERSON (1978) isolou polissacarídeos de alto peso molecular contendo glucanas, de filtrados de cultura de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., agente causal da antracnose do feijoeiro, e de *C. trifolii* Bain e Essary e *C. destructivum* O'Gara, agentes causais da antracnose do trevo (*Trifolium incarnatum* L. e *Trifolium procumbens* L., respectivamente). Essas substâncias induziam igualmente o acúmulo de fitoalexinas e reação de hipersensibilidade em tecidos de feijoeiro. ANDERSON (1980) observou também que componentes extracelulares produzidos por três raças de *C. lindemuthianum* apresentaram diferenças quanto a sua composição química e atividade elicitora da síntese de faseolina em tecidos de feijoeiro. Estas substâncias possuíam propriedades raça-específicas. Mais recentemente, TEPER & ANDERSON (1986) isolaram componentes extracelulares da raça α de *C. lindemuthianum* que exibiam atividade elicitora

diferencial em cultivares de feijoeiro. O elicitor, caracterizado como sendo uma galactoglucomanana, estimulava a síntese de fitoalexinas, em altas concentrações, no cultivar incompatível (resistente) "Dark Red Kidney". Entretanto, a galactoglucomanana da raça α de *C. lindemuthianum* não era ativa no cultivar suscetível "Great Northern". Não foram detectados quaisquer componentes extracelulares da raça β apresentando atividade elicitora da síntese de fitoalexinas nos cultivares compatíveis (suscetíveis) "Dark Red Kidney" e "Great Northern". Estes resultados revelaram a existência de elicitores raça-específicos em *C. lindemuthianum*, reforçando as idéias defendidas por KEEN (1975), KEEN & LEGRAND (1980) e KEEN & YOSHIKAWA (1983).

DE WIT & ROSEBOOM (1980) isolaram de filtra-dos de cultura, micélio e parede celular de *Cladosporium ful*vum Cooke (= *Fulvia fulva* (Cooke) Cif.), glicoproteínas ativas como elicitores da síntese de rishitina em folhas e fru-tos de tomateiro, de pisatina em ervilha e de gliceolina na soja. Estas substâncias, ativas a concentrações de 250 μ g/ml, apresentavam peso molecular variando de 30.000 a 250.000. Estes elicitores, identificados como peptídeogalactoglucoma-nas não se mostraram raça ou cultivar-específicos em fo-lhas e frutos de tomateiro (DOW & CALLOW, 1979; LAZAROVITS & HIGGINS, 1979 e DE WIT & ROSEBOOM, 1980).

HADWIGER & BECKMANN (1980) isolaram uma qui-tosana, um derivado de β -1 $\rightarrow$ 4 glucosamina, das paredes celu

lares de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *pisi* (Jones) Snyder e Hansen, capaz de elicitar a síntese de pisatina em vagens de ervilha.

LEE & WEST (1981) isolaram uma glicoproteína de filtrado de cultura de *Rhizopus stolonifer* (Fr.) Lind., com atividade elicitora da síntese da fitoalexina casbena em mamona (*Ricinus communis* L.), possuindo também atividade poligalacturonásica. Esse elicitor, de peso molecular de 32.000, perdia tanto sua atividade elicitora como a atividade enzimática, quando exposto à temperaturas altas.

HÜMME et alii (1981) extraíram, por autoclavagem, substâncias de natureza protéica e polissacarídica das paredes celulares de tubos germinativos de uredíniosporos de *Uromyces phaseoli* (Reb.) Wint. var. *typica* Arth., agente causal da ferrugem do feijoeiro. Estas substâncias induziam resistência e síntese de fitoalexinas, após infiltração em folhas primárias de um cultivar de feijoeiro suscetível a *U. phaseoli*. Os carboidratos, constituídos principalmente de glucanas, e as proteínas presentes nos extratos ativos de *U. phaseoli* não puderam ser separados pelas técnicas utilizadas. Entretanto, os autores sugeriram que a atividade biológica do extrato era devido às glucanas. Estas substâncias se revelaram inespecíficas quanto a sua ação elicitora, pois eram ativas tanto na variedade resistente 017, como na variedade suscetível "Favorit".

BOSTOCK et alii (1982) isolaram do micélio de

P. infestans os ácidos graxos eicosapentanóico e araquidônico, que possuíam atividade elicitora da síntese de rishitina nos tecidos de batata. Estes ácidos graxos não eram ativos em cotilédones de soja (KEEN et alii, 1983). KURANTZ & OSMAN (1983) isolaram do micélio de *P. infestans*, uma β -glucana solúvel, a qual aumentava a atividade elicitora de rishitina, dos ácidos graxos extraídos do mesmo fungo.

MAYAMA et alii (1986) isolaram a toxina victorina de *Helminthosporium victoriae* Meehan e Murphy, agente causal da requeima em aveia, e verificaram que a mesma elicita a síntese das fitoalexinas avenaluminas no cultivar de aveia contendo o alelo dominante Pc-2. Este gene confere sensibilidade ao hospedeiro em relação à toxina victorina e portanto suscetibilidade a *H. victoriae*, como também resistência a algumas raças de *P. coronata* var. *avenae*, agente causal da ferrugem em aveia. A atividade elicitora era máxima quando eram utilizadas concentrações de victorina ao redor de 10 pg/ml. Por outro lado, a victorina não elicita a produção detectável de avenalumina na linhagem de aveia pc-2, resistente a *H. victoriae* e suscetível a raças de *P. coronata* var. *avenae*, quando aplicada em concentrações de 10 ng/ml. Inibidores da síntese protéica, tais como cicloheximida e blasticidina S, inibiram a produção de avenalumina em folhas de aveia Pc-2, tratadas com victorina. Os autores concluíram que a victorina funciona como um elicitor específico da produção de avenalumina. Foi sugerido ainda que

esta toxina pode desencadear uma reação de hipersensibilidade, por se assemelhar a elicitores raça-específicos presentes em raças de *P. coronata* f.sp. *avenae*, avirulentas à linhagem de aveia Pc-2.

Cumprе mencionar, conforme verificado por vários pesquisadores, que tecidos vegetais contêm substâncias as quais podem agir como elicitores da síntese de fitoalexinas, tendo sido estes denominados de **elicitores constitutivos** ou **endógenos** (HARGREAVES & BAILEY, 1978; HAHN et alii, 1981; BAILEY, 1982 e DAVIS et alii, 1984). Foi sugerido que estes elicitores endógenos seriam liberados de células vegetais mortas ou injuriadas, como consequência de danos às plantas, por exemplo, durante a resposta de hipersensibilidade ou durante a fase necrotrófica do parasita. Estas substâncias poderiam ainda ser liberadas por enzimas pectinolíticas do patógeno ou originárias do hospedeiro, durante os primeiros eventos da patogênese, estimulando a síntese de fitoalexinas nas células vizinhas, sadias. Vários elicitores endógenos se mostraram termoestáveis, tendo sido identificados como fragmentos pécticos da parede celular das plantas.

2.3. MECANISMO DE AÇÃO DOS ELICITORES E SEU PAPEL NOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A extensa pesquisa realizada, voltada para o isolamento e caracterização química de elicitores de origem

microbiana capazes de estimular a síntese de fitoalexinas em plantas hospedeiras e não-hospedeiras a estes microorganismos visou, sobretudo, contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de resistência de plantas às doenças. A maioria dos elicitores bióticos isolados apresentaram natureza polissacarídica, glicoprotéica e protéica, sendo específicos ou inespecíficos quanto à sua habilidade elicitora da síntese de fitoalexinas.

ALBERSHEIM & VALENT (1978) e DARVILL & ALBERSHEIM (1984) sugeriram que a síntese de fitoalexinas é um mecanismo efetivo e geral utilizado pelas plantas para se defenderem do ataque de microorganismos não-patogênicos. A síntese e o acúmulo de fitoalexinas no sítio de infecção poderiam ser desencadeados pelos elicitores bióticos inespecíficos, isto é, componentes estruturais da parede celular de microorganismos, os quais seriam previamente reconhecidos pelas plantas. Assim, um microorganismo patogênico a um determinado hospedeiro teria desenvolvido mecanismos para evitar os efeitos tóxicos das fitoalexinas, uma vez que raças virulentas de determinados patógenos contêm substâncias elicitoras ativas.

KEEN (1982) também sugeriu que a função dos elicitores inespecíficos consiste na elicitação de mecanismos gerais de resistência de espécies de plantas não-hospedeiras. Patógenos bem sucedidos, teriam, de acordo com essa hipótese, desenvolvido meios para evitar o reconhecimento de

seus elicitores inespecíficos por plantas hospedeiras ou teriam desenvolvido meios para tolerar ou degradar as fitoalexinas do hospedeiro (KEEN, 1986).

De fato, várias hipóteses têm sido aventadas, para explicar a síntese diferencial de fitoalexinas observada em interações compatíveis e incompatíveis, nos vários sistemas hospedeiro-patógeno que têm sido estudados. MAYAMA et alii (1986) e KEEN (1986) acreditam que a indução específica de fitoalexinas pode ser explicada pela ação de elicitores específicos.

Outra hipótese que tem sido defendida por alguns pesquisadores, consiste na ação conjunta de elicitores inespecíficos e supressores específicos da síntese de fitoalexinas (DOKE & TOMIYAMA, 1980; ZIEGLER & PONTZEN, 1982 e HERMANN & ZIEGLER, 1984).

ZIEGLER & PONTZEN (1982) verificaram que uma invertase extracelular de *Pmg*, anteriormente purificada e caracterizada (ZIEGLER & ALBERSHEIM, 1977), inibia o acúmulo da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja tratados com o elicitor glucana isolado do mesmo patógeno. Esta substância com atividade supressora, foi caracterizada como uma glicoproteína, sendo que sua porção polissacarídica era constituída principalmente de resíduos de manose unidos por ligações α . O supressor promovia uma inibição raça-específica da ação elicitora da glucana de *Pmg*. Assim, a invertase da raça 1 suprimia o acúmulo de gliceolina nos cultivares de soja

compatíveis "Harosoy" e "Wayne", mas não no cultivar incompatível "Harosoy 63". Entretanto, a invertase da raça 3, que é compatível com "Harosoy", "Wayne" e "Harosoy 63", inibia o acúmulo de gliceolina nos três cultivares. A porção polissacarídica da molécula era essencial para a atividade supressora.

DOKE & TOMIYAMA (1980) isolaram glucanas solúveis de *P. infestans*, as quais inibiam o acúmulo de fitoalexinas e a reação de hipersensibilidade em tubérculos de batata. Entretanto, DARVILL & ALBERSHEIM (1984) colocaram em dúvida a significância fisiológica destas observações, devido a alta concentração de supressores requerida para a atividade (1-10 mg/ml).

Tem sido observado que o acúmulo de fitoalexinas em plantas após infecção microbiana está frequentemente associado, ou se segue à morte rápida de células vegetais durante a resposta de hipersensibilidade. Assim, BAILEY (1982) aventou a hipótese de que os elicitores bióticos e abióticos, agem meramente como fitotoxinas potentes, causando eventos similares àqueles iniciados pela morte de células vegetais na resposta de hipersensibilidade. A morte celular, independentemente de sua causa, libera os elicitores endógenos, os quais ativam a síntese de fitoalexinas e possivelmente outras reações de defesa nas células vivas adjacentes (BAILEY, 1982). EPPERLEIN et alii (1986) sugeriram que os elicitores abióticos provocam a peroxidação de lipídeos pela

ação de radicais livres. O dano causado às membranas celulares facilitaria a difusão de elicitores endógenos, os quais permitem a transcrição de genes requeridos para a síntese de fitoalexinas. LYON & ALBERSHEIM (1982) propuseram que enzimas degradativas de substâncias pecticas, liberadas pelo microorganismo invasor, ou enzimas liberadas pelas células hospedeiras danificadas poderiam liberar, destas últimas, fragmentos de elicitores endógenos ativos. Estes funcionariam como mensageiros secundários no processo de elicitação da síntese de fitoalexinas.

Segundo EBEL (1986) e EBEL & GRISEBACH (1988), o evento chave na indução da síntese de fitoalexinas mediada por elicitores bióticos de origem microbiana, é sua interação com um sítio primário ou receptor localizado provavelmente no plasmalema das células vegetais.

De fato, YOSHIKAWA et alii (1983) verificaram a existência de um sítio de ligação, termolábil, na membrana de células de soja, para a micolaminarina isolada de *Phytophthora* spp. Entretanto, este composto apresentou baixa atividade elicitora quando comparada com as β -glucanas isoladas de *Pmg*. COSIO et alii (1988) identificaram sítios de ligação específicos e de alta afinidade, presentes em frações isoladas de membranas de raízes, hipocótilos, cotilédones e em cultura de células de soja, para o elicitor β -glucana de *Pmg*. Os autores observaram, ainda, que havia uma correlação fortemente positiva entre a habilidade dos oligossacarídeos em com

petir pelos sítios de ligação e a atividade destes ligantes como elicitores da síntese de gliceolina, em bioensaios em cotilédones de soja.

Entretanto, ainda se desconhece como a ligação de fragmentos da parede celular de *Pmg* ao receptor localizado na membrana plasmática do hospedeiro, dá origem ao sinal que resulta no aumento da transcrição de genes para as enzimas envolvidas na biossíntese da gliceolina. EBEL & GRISEBACH (1988) sugerem, baseados em resultados obtidos por STÄB & EBEL (1987), que a resposta inicial que se segue à ligação do elicitor na membrana de células de soja, consiste em uma mudança nos fluxos de substratos (íons) através da membrana plasmática, podendo incluir o fluxo de Ca^{2+} .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. FONTE DE MATERIAL

3.1.1. Fungos

Para a obtenção dos elicitores foram utiliza
dos como fonte de material os seguintes fungos:

- (1) *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Foi utilizado extrato de células autolisadas de preparação comercial desta levedura (Difco Co., Detroit Michigan, USA).
- (2) *Hemileia vastatrix* Berkeley et Broome. Urediniosporos de *H. vastatrix* foram coletados no campo (Fazenda Santa Elisa, Instituto Agronômico - Campinas) diretamente de fo-lhas de cafeeiros (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) na-turalmente infectados. Foram selecionadas, para a cole-ta dos esporos, somente as lesões que não apresentavam si-nais macroscópicos de necrose ou da presença do hiperpa-rasita *Verticillium hemileiae* Bouriquet (= *Verticillium lecanii* Zimm.).

Os urediniosporos foram recolhidos, com auxí-lio de um tubo de polietileno, raspando-se suavemente as le-

sões da superfície abaxial das folhas. Após a coleta, os uredíniosporos foram peneirados em peneiras Granutest (Laborlex Comércio de Equipamentos para Laboratório Ltda., São Paulo, SP) com malhas de 0,149 mm e de 0,044 mm para eliminar impurezas, sendo em seguida acondicionados em criotubos e conservados em nitrogênio líquido (-196°C).

3.1.2. Planta

Foram utilizadas nos testes biológicos as variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina.

As sementes de soja foram obtidas da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, SP. A semeadura foi feita em areia peneirada e esterilizada (30min, 121°C , ou em substrato organo-vegetal estéril "Plant Cell" comercializado pela Plantágil Comercial Agrícola Ltda., São Paulo, SP. (mistura de material orgânico/vermiculita/formulações ricas em fósforo e potássio), contidos em bandejas plásticas (40 x 50 x 8,5 cm). As bandejas foram mantidas em câmaras a uma temperatura de $\pm 24^{\circ}\text{C}$, sob umidade relativa de $\pm 65\%$ e a um fotoperíodo de 12 h com iluminação de ca. de 1.800 lux. Para os testes biológicos foram utilizadas plântulas de 9 a 10 dias de idade.

3.2. OBTENÇÃO DOS ELICITORES

3.2.1. *S. cerevisiae*

A metodologia empregada para a extração da substância elicitora presente no extrato comercial da levedura *S. cerevisiae* baseou-se naquela utilizada por HAHN & ALBERSHEIM (1978).

O extrato comercial de *S. cerevisiae* (100g) foi dissolvido em 500 ml de água bidestilada autoclavada (30 min, 121°C), sendo submetido em seguida à precipitação com etanol P.A. a 80% (v/v), à temperatura ambiente. A suspensão foi mantida por 4 dias a 6°C, para a sedimentação do precipitado formado. O sobrenadante foi, em seguida, decantado e descartado e o sedimento gomoso que permaneceu no frasco foi dissolvido em 500 ml de água bidestilada autoclavada. A solução obtida foi reprecipitada com etanol a 80% (v/v). O sedimento formado foi dissolvido em 800 ml de água bidestilada autoclavada. Essa solução foi dialisada extensivamente (144 h), sob agitação, a 6°C, contra água bidestilada trocada a cada 12 h. Como membrana de diálise foram utilizados os tubos de membrana Spectrapor (Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, USA), com vol/cm de 3,2 ml, e com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 6.000 a 8.000 daltons. O precipitado formado no interior da membrana de diálise foi removido por filtração da fração não-dia-

lisável, em filtros de membrana Sartorius (Sartorius GmbH, Göttingen, BRD) de 12 μm (pré-filtro) e 0,8 μm , e o filtrado obtido consistiu na preparação elicitora de *S. cerevisiae* (LEV-SD). Essa preparação foi utilizada como controle da síntese de fitoalexina nas diversas variedades de soja testadas através de bioensaios, uma vez que foi verificado por HAHN & ALBERSHEIM (1978) que a mesma contém glucanas, capazes de desencadear a formação da fitoalexina gliceolina em tecidos de soja. A fração LEV-SD foi submetida a teste químico para determinação da concentração de carboidratos.

3.2.2. *H. vastatrix*

Os uredíniosporos de *H. vastatrix* acondicionados nos criotubos, foram retirados do nitrogênio líquido e secos em dessecador a vácuo durante 24 h. Em seguida os mesmos foram pesados (6g) e submetidos à autoclavagem (121°C, 30 min), após terem sido acondicionados em Erlenmeyer, fechado cuidadosamente com algodão hidrófobo e papel de alumínio para evitar a entrada de vapor d'água. Após a autoclavagem, os uredíniosporos foram misturados com 300 ml de água bidestilada autoclavada, e a suspensão obtida (20 mg de uredíniosporos/ml) foi submetida à agitação em placa agitadora magnética, por 3 h à temperatura ambiente. Em seguida a suspensão foi filtrada em filtros Sartorius de 12 μm (pré-filtro), de 0,45 μm e de 0,22 μm . O filtrado, denominado filtrado de

esporos autoclavados (FEA), consistiu na preparação bruta do elicitor estudado. Esta fração foi submetida a bioensaios, para determinação de sua atividade elicitora da síntese de fitoalexinas em soja e a testes químicos.

3.3. BIOENSAIO E SELEÇÃO DA VARIEDADE DE SOJA EMPREGADA PARA O MESMO

Com a finalidade de selecionar entre as variedades de soja IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina, aquela mais adequada quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e à uniformidade de resposta em presença de um elicitor ativo nestes tecidos, foi empregado o bioensaio em cotilédones de soja, desenvolvido por AYERS et alii (1976c) e modificado por ZIEGLER & PONTZEN (1982). Como elicitor foi utilizada a fração LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae*, diluída seis vezes em água bidestilada estéril. O bioensaio consistiu no seguinte:

Após 9 a 10 dias da data do plantio (em areia peneirada e estéril) das diferentes variedades de soja conforme descrito no item 3.1.2., os cotilédones foram destacados das plântulas e lavados com água bidestilada estéril por três vezes. Os cotilédones foram então enxugados suavemente com papel absorvente fino. Uma secção de ca. de 1mm de espessura e 6 mm de diâmetro foi cortada da superfície inferior de cada co

tilédone, com auxílio de uma lâmina previamente esterilizada. Dez cotilédones foram então colocados sobre cinco discos de papel de filtro FIT-80 (Fitec - Ind.Com. Filtros Ltda., São Paulo, SP) previamente umedecidos com água bidestilada estéril e colocados em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Uma alíquota de 75 μ l da fração LEV-SD foi aplicada sobre a lesão feita pelo corte em cada cotilédone. Como controle, foi utilizada água bidestilada estéril. As placas foram fechadas e incubadas por 20 h a 26°C no escuro. A adição de antibióticos foi evitada para impedir que o acúmulo de gliceolina fosse influenciado por qualquer outra substância que não aquelas que estivessem sendo testadas. Cuidados foram tomados para garantir, tanto quanto possível, esterilidade durante a realização de cada experimento. Todos os bioensaios foram efetuados em câmara de fluxo laminar (Köttermann GmbH, Uetze-Hänigsen-BRD) previamente desinfetada e todo o material utilizado para os mesmos foi esterilizado por autoclavagem (30 min, 121°C). Exames microscópicos regulares foram efetuados nas gotas da solução teste, após o final do tempo de incubação, para se detectar qualquer contaminação por microorganismos.

Após o período de incubação os cotilédones de cada placa foram cuidadosamente transferidos para Erlenmeyers contendo 20 ml de água bidestilada estéril, os quais foram agitados por uma hora para extrair a gliceolina formada. A suspensão aquosa foi em seguida filtrada em pré-filtro de fi

bra de vidro da Sartorius. A absorbância do filtrado foi determinada a 285 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Pye Unicam SP8-400 UV/VIS (Pye Unicam Ltd, Cambridge, England) e como referência, água bidestilada estéril. A absorbância ($A_{285\text{nm}}$) foi utilizada como medida do conteúdo de gliceolina e portanto da atividade elicitora, uma vez que existe uma correlação linear entre estes dois parâmetros (AYERS et alii, 1976c).

A variedade de soja selecionada foi utilizada nos bioensaios subsequentes, sendo empregado para o seu plantio o substrato organo-vegetal "Plant Cell", conforme descrito no item 3.1.2.

3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ELICITORA DA SÍNTESE DE GLICEOLINA DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DE *H. vastatrix*

Para determinar a atividade elicitora da síntese de fitoalexinas da preparação bruta FEA, bem como das frações subsequentes resultantes de sua purificação, foram efetuados bioensaios em cotilédones de soja conforme descrito no item 3.3. As frações foram submetidas ao bioensaio na concentração de 40 Eq mg de urediniosporos por ml. Aliquotas de 75 μl de cada fração foram aplicadas respectivamente sobre a lesão feita em cada cotilédone, utilizando-se para cada bioensaio um conjunto de dez cotilédones para determina-

ção da atividade elicitora de cada fração. As substâncias submetidas aos bioensaios foram dissolvidas somente em água bidestilada estéril. O uso de tampões foi evitado visando impedir que a síntese de gliceolina fosse influenciada por outras substâncias que não aquelas sob estudo. Foi utilizada para estes bioensaios a variedade de soja previamente selecionada conforme descrito no item 3.3.

A atividade elicitora da preparação FEA foi determinada submetendo-se diferentes concentrações desta fração ao bioensaio em cotilédones de soja. Foram utilizadas além da fração FEA na concentração de 40 Eq mg de urediniosporos por ml, frações obtidas pela diluição desta preparação, duas, quatro e oito vezes com água bidestilada estéril.

Cumpre mencionar que procedeu-se à determinação em espectrofotômetro (Pye Unicam SP8-400 UV/VIS) das absorbâncias a 285 nm de soluções preparadas pela diluição de 750 µl de cada fração em 20 ml de água bidestilada estéril, respectivamente. Este procedimento permitiu determinar se as frações assim diluídas apresentavam absorbância a 285 nm. Em caso afirmativo, as absorbâncias a 285 nm dos filtrados obtidos conforme descrito no item 3.3. foram determinadas utilizando-se como referência as respectivas frações diluídas, ao invés de água bidestilada estéril. Este procedimento teve por objetivo evitar que as absorbâncias dos filtrados determinadas a 285 nm, e utilizadas como medida do conteúdo de gliceolina e portanto da atividade elicitora, incluíssem a

absorbância de outras substâncias além daquela devido à gliceolina.

3.5. PURIFICAÇÃO DO ELICITOR DE *H. vastatrix*

3.5.1. Precipitação etanólica fracionada

A preparação bruta FEA de *H. vastatrix* (240ml, 20 Eq mg de urediniosporos/ml) obtida conforme descrito no item 3.2.2., foi concentrada sob pressão reduzida a 40°C em rotoevaporador (Büchi Laboratoriums - Technik AG, Flawil, Schweiz) para um volume de 120 ml. Em seguida, esta fração concentrada (40 Eq mg urediniosporos/ml), foi submetida à precipitação fracionada com etanol P.A. nas concentrações de 20, 40, 60 e 80% (v/v), visando uma separação inicial das glicoproteínas, proteínas e carboidratos. Para tanto, procedeu-se como se segue:

Após o pH da fração FEA (117 ml; 40 mg/ml) ter sido ajustado para 7,0, adicionou-se à mesma, etanol P.A. a uma concentração final de 20% (v/v). A adição de etanol foi feita sob agitação e no gelo. A suspensão obtida foi mantida a 4°C por 24 h, sendo em seguida centrifugada por 20 min a 2.500 g em centrífuga de mesa (Tominaga Works. Ltd., Japan). O sedimento foi seco sob uma corrente de nitrogênio gasoso e retomado em água bidestilada estéril em um volume

igual ao inicial (117 ml). Esta fração foi designada por FEA-20. O volume do sobrenadante foi medido, acrescentando-se, em seguida, ao mesmo, etanol P.A. até 40% (v/v), após o pH ter sido reajustado para 7,0. A suspensão obtida foi mantida a 4°C por 24 h, sendo então centrifugada por 20 min a 2.500 g. O sedimento foi seco sob nitrogênio gasoso e retomado em 117 ml de água bidestilada estéril, sendo que a fração resultante foi denominada de FEA-40. Após o pH do sobrenadante ter sido reajustado para 7,0, adicionou-se ao mesmo, etanol até 60% (v/v). Em seguida procedeu-se como nas etapas anteriores. A fração resultante da precipitação etanólica a 60% foi designada por FEA-60 (117 ml) e o sobrenadante obtido foi tratado com etanol até uma concentração final de 80% (v/v). A fração obtida a partir do sedimento resultante da precipitação etanólica a 80%, foi denominada de FEA-80. O sobrenadante, obtido nesta última etapa, foi submetido à secagem em rotoevaporador, a 40°C, sob pressão reduzida. O resíduo foi retomado em 117 ml de água bidestilada estéril e a fração resultante foi designada por FEA-Sn. O volume de etanol adicionado na primeira etapa (1) e nas etapas subsequentes (2) foi calculado respectivamente pelas seguintes fórmulas:

$$(1) \quad V_e = \frac{X \cdot V_o}{100 - X}$$

V_e = volume de etanol a ser adicionado (ml);

X = concentração de etanol desejada (%);
 Vo = volume inicial da fração (ml).

$$(2) \quad V_e = \frac{(Y-X) V}{100 - Y}$$

V_e = volume de etanol a ser adicionado (ml);
 Y = concentração de etanol desejada (%);
 X = concentração de etanol da etapa anterior (%);
 V = volume da fração (ml) (Vo + volume total de etanol adicionado).

Cumprе mencionar, a título de observação, que a medida do volume do sobrenadante feita antes de cada precipitação permitiu constatar se houve ou não perda por evaporação do etanol adicionado na etapa anterior. Esta perda, sempre que constatada, foi corrigida por uma reposição do volume de etanol evaporado.

Todas as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação FEA com etanol foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) para determinação de sua atividade elicitora da síntese de gliceolina e a testes químicos.

3.5.2. Cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B

A fração mais ativa como elicitora da síntese de gliceolina proveniente da precipitação fracionada da pre-

paração FEA com etanol, foi submetida à cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). A utilização desta técnica visou a separação de polissacarídeos e glicoproteínas, baseando-se na sua afinidade pela referida lectina.

Para tanto, 40 ml de suspensão de Concanavalina-A Sepharose 4B foram submetidos a degaseificação por 15 min, com auxílio de uma bomba de vácuo (Primar Ltda., São Paulo, SP). Em seguida, uma coluna de vidro adaptada a uma jaqueta para refrigeração (1,6 cm de diâmetro interno e 20 cm de altura; K 16/20 - Pharmacia) foi empacotada com a suspensão, segundo as instruções dos manuais preparativos da Pharmacia "Affinity chromatography-principles and methods" (1974) e "Gel filtration - theory and practice" (1979). A coluna foi equilibrada com 200 ml de tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,2, previamente degaseificado, e foi refrigerada pela circulação de água através da jaqueta, proveniente de um banho térmico (modelo 2209 Multitemp, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) mantido a 4°C. Em seguida, a coluna já estabilizada (1,6 cm de diâmetro interno x 14 cm de altura, correspondendo a um volume de ca. 28 ml de gel sedimentado e contendo ca. de 280 mg de Concanavalina A) foi acoplada a um coletor de frações automático da LKB, modelo 2070 Ultrorac II.

Uma alíquota (105 ml) da fração elicitora foi submetida à secagem em rotoevaporador, a 40°C, sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi dissolvido em 9 ml de

tampão fosfato de sódio (PBS) 0,02M, pH 7,2. Em seguida esta fração foi filtrada em membrana Sartorius de 0,22 μ m e o filtro lavado com 2 ml do mesmo tampão. A amostra (11 ml) foi, então, aplicada cuidadosamente sobre o leito da coluna, a qual foi eluída com 190 ml do tampão PBS 0,02M, pH 7,2, seguido de 190 ml do mesmo tampão contendo 4% (p/v) de metil- α -D-manopiranosídeo (Fluka, AG, Chem.Fabrik, Buchs, Switzerland). Foram coletadas 87 frações de 4,5 ml cada, as quais foram submetidas a testes químicos. As frações de n^{os} 4 a 13 (eluato I) e as de n^{os} 14 a 45 (eluato Ia), eluídas com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2, e as frações de n^{os} 46 a 87 (eluato II) eluídas com o mesmo tampão contendo 4% de metil- α -D-manopiranosídeo, foram respectivamente reunidas e dialisadas exaustivamente contra água bidestilada (100h). A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, efetuando-se 5 trocas de água, e utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 6.000 a 8.000 daltons. Em seguida, as frações, retidas pelas membranas de diálise, foram concentradas sob pressão reduzida, a 40°C, em evaporador rotatório, para um volume de 105 ml cada, sendo posteriormente filtradas em filtros de 0,22 μ m (Sartorius).

Essas frações, denominadas FEA-EI (eluato I), FEA-EIa (eluato Ia) e FEA-II (eluato II), foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) para determinação de sua atividade elicitora da síntese de gliceolina e a testes químicos.

3.5.3. Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

A fração mais ativa como elicitor da síntese de gliceolina, proveniente da cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B, foi submetida à cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose (Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, USA). A utilização desta técnica visou o fracionamento das substâncias presentes nesta fração, baseando-se na sua afinidade pelo referido trocador aniônico.

Para tanto, 15 g de DEAE-celulose (forma fibrosa; "fine mesh"; capacidade de troca iônica ca. 0,9 meq/g) foram adequadamente preparadas para uso e a suspensão obtida foi equilibrada com o tampão PBS 5mM, pH 7,2, utilizado como eluente inicial, conforme instruções do manual preparativo da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, California, USA) "Chromatography, electrophoresis and membrane filtration" (1976) e metodologia descrita por PETERSON (1975). Em seguida, uma coluna de vidro (1,6 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura; K16/30 - Pharmacia) foi empacotada com a suspensão, previamente desgaseificada por 10 min, segundo as instruções do manual preparativo da Pharmacia "Sephadex ion exchangers - a guide to ion exchange chromatography" (1970) e equilibrada com 250 ml do mesmo tampão PBS. A coluna já estabilizada (1,6 cm de diâmetro interno x 26 cm de altura, correspondendo a um volume de ca. 52 ml de celulose sedimentada) foi acoplada a um coletor de amostras automático LKB, modelo 2070 UI-

trorac II. Para evitar variações na taxa de fluxo ("flow rate") do eluente através da coluna, utilizou-se uma bomba peristáltica (Buchler Instruments, Inc. Fort Lee NJ, USA), ao invés do campo gravitacional.

Uma alíquota (90 ml) da fração elicitora foi submetida à secagem em rotoevaporador, a 40°C, sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi dissolvido em 36 ml de tampão PBS 5mM, pH 7,2. A amostra (36 ml) foi, então, aplicada cuidadosamente sobre o leito da coluna, a qual foi eluída com 70 ml do tampão PBS 5mM, pH 7,2, seguida de eluição em gradiente linear de cloreto de sódio 0 a 0,5M preparado no mesmo tampão (volume total do gradiente de 260 ml). Para a produção do gradiente de concentração linear foi utilizada a câmara misturadora de gradiente "Gradient Mixer GM-1" da Pharmacia. A taxa de fluxo utilizada durante a cromatografia foi de 11,3 ml/cm².h. Foram coletadas 74 frações de 4,8 ml cada, as quais foram submetidas a testes químicos. As frações de n°s 6 a 21 (eluato A), eluídas com o tampão inicial PBS 5mM, pH 7,2, e as de n°s 22 a 50 (eluato B) e de n°s 66 a 74 (eluato C), eluídas no gradiente linear de cloreto de sódio, foram respectivamente reunidas e dialisadas exaustivamente contra água bidestilada (96 h). A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, efetuando-se quatro trocas de água e utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 6.000 a 8.000 daltons. Em seguida, as frações retidas no interior das membranas de

diálise, foram submetidas à secagem sob pressão reduzida, a 40°C, em evaporador rotatório, e cada resíduo obtido foi dissolvido em 90 ml de água bidestilada estéril. As frações foram então, filtradas em membranas de 0,22 µm (Sartorius).

Essas frações, denominadas FEA-A (eluato A), FEA-B (eluato B) e FEA-C (eluato C), foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) para determinação de sua atividade elicitora da síntese de gliceolina e a testes químicos.

3.5.4. Filtração em Bio-Gel P-60

A fração mais ativa como elicitor da síntese de gliceolina, proveniente da cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose, foi submetida à filtração em gel utilizando-se Bio-Gel P-60 (Bio-Rad Laboratories, California, USA). A utilização desta técnica visou a separação das substâncias presentes nesta fração de acordo com o tamanho molecular.

Para tanto, 3,9 g de Bio-Gel P-60 (xerogel), 100-200 mesh (tamanho de partícula 75-150 µ; limite de exclusão igual a 60.000 daltons e intervalo de fracionamento de 3.000 a 60.000 daltons) foram previamente embebidos em excesso de tampão PBS 0,1M, pH 7,2 (150 ml) e a suspensão obtida permaneceu em repouso por 4h à temperatura ambiente para a completa hidratação do gel. A preparação do gel foi feita segundo as instruções do manual preparativo da Bio-Rad

"Chromatography, electrophoresis and membrane filtration"(1976). Em seguida, uma coluna de vidro (1,6 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura; K 16/30 - Pharmacia) foi cuidadosamente em pacotada com a suspensão, previamente desgaseificada por 20 min, de acordo com as instruções do referido manual preparativo da Bio-Rad (1976) e equilibrada com 250 ml de tampão PBS 0,1M, pH 7,2. A coluna já estabilizada (1,6 cm de diâmetro interno x 25,5 cm de altura, correspondendo a um volume de ca. 51 ml de gel sedimentado) foi acoplada a um coletor de amostras automático LKB, modelo 2070 Ultrorac II. Para evitar variações na taxa de fluxo ("flow rate") do eluente através da coluna, utilizou-se a bomba peristáltica, ao invés do sistema de fluxo gravitacional. Para o empacotamento da coluna foi utilizado um fluxo de 12 ml/cm².h. Em seguida, procedeu-se à determinação experimental do volume externo (Vo) e do volume interno (Vi) eluídos da coluna de Bio-Gel P-60, utilizando-se respectivamente soluções feitas em tampão PBS 0,1M, pH 7,2, de "Blue dextran 2000" (Pharmacia) (2 mg/ml) e de manose P.A. (1 mg/ml). Para a eluição dessas substâncias marcadoras utilizou-se o tampão PBS 0,1M pH 7,2 e um fluxo de 8,2 ml/cm².h. Foram coletadas frações de 3 ml cada. O "Blue-dextran 2000" foi detectado nas frações pela medida da absorbância a 340 nm utilizando-se um espectrofotômetro Pye Unicam SP8-400 UV/VIS e a manose foi detectada nas frações através de teste químico.

Uma alíquota (82 ml) da fração elicitora foi

submetida à secagem em rotoevaporador, a 40°C, sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi retomado em 3 ml de tampão PBS 0,1M, pH 7,2. A amostra (3 ml) foi aplicada cuidadosamente sobre o leito da coluna, a qual foi eluída com 80 ml do mesmo tampão. A taxa de fluxo utilizada durante a cromatografia foi de 8,2 ml/cm².h. Foram coletadas 27 frações de 3 ml cada, as quais foram submetidas a testes químicos. As frações de n°s 4 a 7 (eluato 1) e as frações de n°s 8 a 12 (eluato 2) foram respectivamente reunidas e dialisadas exaustivamente contra água bidestilada (90 h). A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, efetuando-se três trocas de água e utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 6.000 a 8.000 daltons. Em seguida, as frações retidas no interior das membranas de diálise, foram submetidas à secagem sob pressão reduzida, a 40°C, em evaporador rotatório, e cada resíduo obtido foi dissolvido em 82 ml de água bidestilada estéril. As frações foram então, filtradas em membranas de 0,22 µm (Sartorius).

Essas frações, denominadas FEA-P60-1 (eluato 1) e FEA-P60-2 (eluato 2), foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) para determinação de sua atividade elicitora da síntese de gliceolina e a testes químicos.

3.6. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ELICITORA DA SÍNTESE DE GLICEOLINA DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DE *H. vastatrix*

Para a comparação das atividades elicitoras da síntese de gliceolina da preparação FEA de *H. vastatrix* e das frações subsequentes resultantes de sua purificação, foi empregado o procedimento descrito por AYERS et alii (1976a).

Para tanto, as atividades elicitoras das frações foram previamente determinadas, através de bioensaios em cotilédones de soja conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4. Em seguida, determinou-se a concentração de cada fração (expressa em µg de carboidratos/ml) requerida para fornecer um valor arbitrário de atividade elicitora (AE). No presente estudo foi escolhido, para efeito de comparação, um valor arbitrário de AE (absorbância a 285nm) igual a 0,5 (HAHN & ALBERSHEIM, 1978). A concentração de carboidratos em cada fração foi previamente determinada através de teste químico. Para comparação das atividades elicitoras relativas das frações foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Y = \frac{[\mu\text{g de carboidrato/ml}] \times 0,5}{AE}$$

Y = concentração da fração requerida para fornecer uma atividade elicitora relativa igual a 0,500;

µg de carboidrato/ml = concentração de carboidratos na fração;

AE = atividade elicitora da fração determinada por bioensaio em cotilédones de soja.

Os valores obtidos através deste cálculo (Y) são inversamente proporcionais às atividades elicitoras relativas das frações. Estas, foram em seguida, normalizadas para a atividade da fração obtida na última etapa de purificação da preparação FEA (item 3.5.4.), tomada como cem (100).

3.7. EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ELICITOR DE *H. vastatrix* NA ATIVIDADE ELICITORA

Para o estudo do efeito da variação da concentração do elicitor de *H. vastatrix* na atividade elicitora, diferentes concentrações da fração obtida na última etapa de purificação da preparação FEA (item 3.5.4.) foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja.

Para tanto, alíquotas de 3, 2 e 1,5 ml desta fração elicitora foram submetidas a liofilização, sendo que cada resíduo obtido foi posteriormente dissolvido em 1 ml de água bidestilada estéril. Através deste procedimento a fração elicitora foi concentrada respectivamente 3, 2 e 1,5 vezes, obtendo-se assim as frações designadas por FEA-P-3C, FEA-P-2C e FEA-P-1,5 C. Alíquotas da fração elicitora (0,5 e 0,25 ml) foram diluídas separadamente com água bidestilada estéril para um volume final de 1 ml. As frações obtidas,

2 e 4 vezes mais diluídas que a original, foram denominadas respectivamente de FEA-P-2D e FEA-P-4D. Em seguida, as frações FEA-P-3C, FEA-P-2C, FEA-P-1,5C, FEA-P-2D e FEA-P-4D e a fração elicitora na concentração original, foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja para a determinação de suas atividades elicitoras, conforme metodologia descrita no item 3.3.

3.8. ESTUDOS SOBRE A NATUREZA QUÍMICA DO ELICITOR DE

H. vastatrix

3.8.1. Testes químicos

Foram empregados os testes químicos quantitativos de Lowry (LOWRY et alii, 1951) e de antrona (DISCHE, 1962) para determinar respectivamente o conteúdo total de proteínas e de açúcares na preparação bruta FEA, bem como nas frações obtidas nas etapas subsequentes de sua purificação.

Para o teste de antrona, foi adicionado a cada 0,5 ml das amostras, mantidas em banho de gelo, 1 ml da solução reagente de antrona (0,2% de antrona em ácido sulfúrico concentrado P.A.). Após uma agitação vigorosa, as amostras contendo o reagente foram aquecidas por 16 min em banho de água fervente. Em seguida, após resfriamento e agitação posterior das amostras, procedeu-se à determinação das res-

pectivas absorbâncias no comprimento de onda de 625 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Pye Unicam SP8-400 UV/VIS. A concentração de carboidratos em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de manose por ml (Eq μg manose / ml), foi determinada utilizando-se uma curva padrão de diferentes concentrações de D-manose (Hopkin e Williams, Essex, England) variando de 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 625 nm.

Para o teste de Lowry, foi adicionado a cada 0,2 ml das amostras, 1 ml da solução reagente C, que consistiu em uma mistura da solução reagente B e de uma solução 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1N, na proporção de 1:50, respectivamente. A solução B foi preparada misturando-se alíquotas iguais de uma solução 1% de sulfato de cobre pentahidratado em água bidestilada e de uma solução 2% de tartarato de sódio em água bidestilada. Em seguida as amostras contendo a solução reagente C, foram agitadas à temperatura ambiente e, após 10 min, adicionou-se 0,1 ml do reagente Folin Ciocalteau 2N (Qeel-Ind.Quim. São Paulo, SP), previamente diluído com água bidestilada (1:1, v/v). As amostras foram agitadas vigorosamente e após 30 min, procedeu-se à determinação das respectivas absorbâncias nos comprimentos de onda de 500 e de 750 nm, em espectrofotômetro ultravioleta-visível. A concentração de proteínas em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de soro-albumina bovina por ml (Eq μg SAB/ml) (Sigma Chem. Co.), foi determinada uti-

lizando-se curvas padrão de diferentes concentrações de SAB, variando de 20 a 500 $\mu\text{g/ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 500 e a 750 nm, respectivamente. A curva padrão obtida a 750 nm foi utilizada para amostras contendo concentrações protéicas menores ou iguais a 29 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.2. Cromatografia em fase gasosa

A técnica de cromatografia em fase gasosa foi utilizada para determinar a composição de monossacarídeos na preparação bruta FEA, bem como nas frações obtidas nas etapas subsequentes de sua purificação. Para tanto, foi empregada a metodologia descrita por JONES & ALBERSHEIM (1972), com modificações, que possibilita a detecção nas amostras, de açúcares neutros, aminoaçúcares e de ácidos urônicos.

3.8.2.1. Preparação das amostras para análise

3.8.2.1.1. Hidrólise dos polissacarídeos

Alíquotas (100 a 2000 μl) das frações provenientes de *H. vastatrix* contendo ca. de 13 a 200 Eq μg de manose/ml, foram liofilizadas em ampolas de vidro previamente lavadas com água bidestilada e acetona. Em seguida, foi adicionado a cada amostra uma solução 2N de ácido trifluoroacético (Merck-Schuchardt, Darmstadt, BRD) contendo 0,01% de mioinositol (Merck-Schuchardt), na proporção de ca. de 200 μl

de solução para cada 200 µg de carboidrato. As ampolas foram submetidas à agitação e em seguida à passagem de uma corrente de nitrogênio gasoso, com a finalidade de garantir uma atmosfera inerte e evitar assim reações secundárias indesejáveis. As ampolas foram imediatamente seladas e submetidas à autoclavagem por 2 h a 121°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em banho de água a 40°C, sob uma corrente de nitrogênio gasoso. Estas etapas permitem a hidrólise de polissacarídeos presentes nas amostras, liberando os resíduos de açúcar, componentes das moléculas. O mioinositol foi utilizado como padrão interno para a análise de aldoses. Foi preparado ainda um controle contendo somente os reagentes utilizados no processo.

3.8.2.1.2. Redução dos monossacarídeos liberados

Após a hidrólise dos polissacarídeos, os monossacarídeos liberados foram convertidos quantitativamente em derivados voláteis, **alditóis acetatos**, através de uma sequência de reações, com a finalidade de viabilizar a sua análise por cromatografia em fase gasosa.

Assim, foi adicionado a cada amostra obtida na etapa anterior, uma solução 1% de borohidreto de sódio (Merck-Schuchardt) em hidróxido de amônio 1N, na proporção de ca. de 120 µl de solução para cada 200 µg de carboidrato. As amostras foram submetidas à agitação, sendo em seguida in-

cubadas à temperatura ambiente por 2 h. Aliquotas de 50 μ l de ácido acético glacial P.A. foram adicionadas a cada amostra até não se observar mais efervescência. Em seguida, foi adicionada a cada amostra uma solução de 10% de ácido acético glacial em metanol P.A., na proporção de 300 μ l de solução para cada 200 μ g de carboidrato. As amostras foram então submetidas à secagem em banho de água a 40°C, sob uma corrente de nitrogênio gasoso. Este processo de adição de solventes e posterior secagem foi repetido mais quatro vezes. Em seguida, foi adicionado a cada amostra metanol absoluto P.A. na proporção de 300 μ l de solvente para cada 200 μ g de carboidrato. As amostras foram submetidas à secagem em banho de água a 40°C, sob uma corrente de nitrogênio gasoso. O processo de adição de metanol e posterior secagem foi repetido por mais quatro vezes. Esta etapa de redução com borohidreto de sódio permite a conversão dos açúcares neutros (aldoses) em seus alditóis correspondentes, e dos ácidos urônicos em ácidos aldônicos.

3.8.2.1.3. Separação dos alditóis e ácidos aldônicos

Os resíduos secos das amostras obtidos na etapa anterior após a última evaporação com metanol, foram retomados em água bidestilada (0,6 ml de água para cada 200 μ g de carboidrato). As soluções foram transferidas respectivamente para frascos contendo ca. de 0,3 g de resina de troca aniônica.

nica AG 1-X1 da Bio-Rad (50-100 mesh; forma cloreto), previamente transformada para forma acetato. Em seguida, as suspensões foram submetidas à agitação por 1 h à temperatura ambiente e centrifugadas em centrífuga de mesa, refrigerada, Sigma 2MK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, BRD) por 10 min a 2.500 g. Os sobrenadantes foram transferidos respectivamente para frascos contendo 0,2 g da resina AG 1-X1. As suspensões obtidas foram submetidas à agitação por 1 h à temperatura ambiente e em seguida centrifugadas (2.500 g/10min). As resinas, após terem sido separadas dos sobrenadantes foram lavadas duas vezes com água bidestilada. Os sobrenadantes e as águas de lavagem foram respectivamente combinados e submetidos à secagem a 40°C sob corrente de nitrogênio gasoso. Estas frações contêm os alditóis formados a partir dos açúcares neutros dos polissacarídeos. As mesmas foram mantidas por 12 h em dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo, antes de serem submetidas à acetilação (item 3.8.2.1.6.).

3.8.2.1.4. Lactonização dos ácidos aldônicos

Os ácidos aldônicos formados pela redução dos ácidos urônicos, permanecem ligados à resina AG 1-X1 durante o processo de lavagem no qual os alditóis são removidos. As resinas foram então, ressuspensas em solução 1N de ácido clorídrico P.A. (1 ml de solução/ 500 µg de carboidrato). As suspensões obtidas foram submetidas à agitação por 30 min, à temperatura ambiente, para extração dos ácidos aldônicos, e

filtradas em filtros de fibra de vidro. Os filtrados foram evaporados à secagem em banho de água a 40°C sob corrente de nitrogênio gasoso. Esta evaporação da solução de ácido clorídrico, converte os ácidos aldônicos em aldonolactonas. Os resíduos obtidos foram mantidos por 12 h em dessecador a vácuo com hidróxido de potássio para remover o ácido clorídrico residual.

3.8.2.1.5. Redução das aldonolactonas a alditóis

As amostras secas contendo as aldonolactonas foram dissolvidas em várias gotas de solução de borato de sódio 10mM, pH 7,5. Em seguida foi adicionado a cada amostra 0,5 ml do tampão borato contendo 10 mg de borohidreto de sódio. As amostras foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente e em seguida foram adicionadas gotas de ácido acético glacial até cessar a efervescência. As amostras foram então, evaporadas à secagem em banho de água a 40°C sob corrente de nitrogênio gasoso. Os resíduos obtidos foram retomados em uma solução 10% de ácido acético glacial em metanol, procedendo-se em seguida exatamente como descrito no item 3.8.2.1.2. Neste procedimento, as aldonolactonas são convertidas respectivamente em seus alditóis. Antes da acetilação (item 3.8.2.1.6.), estas amostras foram mantidas em dessecador a vácuo por 12 h.

3.8.2.1.6. Acetilação das amostras

Em seguida, todas as amostras foram submetidas à acetilação, para transformação dos alditóis, provenientes tanto dos açúcares neutros como dos ácidos urônicos, em seus derivados acetilados voláteis.

Para tanto, foi adicionado a cada amostra em ampolas de vidro, anidrido acético P.A. (Merck), na proporção de ca. de 40 μ l para cada 200 μ g de carboidrato. As ampolas foram seladas e submetidas à autoclavagem por 3 h a 121°C. Em seguida foi acrescentado a cada amostra, água bidestilada (0,2 ml/200 μ g carboidrato). As amostras foram neutralizadas com carbonato de sódio anidro, adicionado em pequenas porções até cessar a efervescência e se formar um pequeno precipitado. Em seguida foi acrescentado a cada amostra, clorofórmio P.A. (0,2 ml/200 μ g carboidrato). Após uma vigorosa agitação da mistura, a fase aquosa foi descartada. A extração foi repetida quatro vezes, acrescentando-se sempre água bidestilada. Após a retirada do excesso de água na última extração, as fases orgânicas contendo os alditóis acetatos, foram cuidadosamente transferidas para pequenos tubos e submetidas à secagem sob uma corrente de nitrogênio gasoso à temperatura ambiente. Cumpre mencionar que todos os solventes orgânicos (Merck-Schuchardt), foram redestilados antes de serem utilizados.

Para a identificação posterior dos resíduos de açúcar presentes nas amostras analisadas, foram utilizadas

como padrões as seguintes substâncias: L-ramnose, L-fucose, D-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, D-galactosamina HCl e D-glucosamina HCl, comercializadas pela Supelco (Inc. Pennsylvania, USA) e L-manono-1,4-lactona (Sigma Chem. Co.), ácido-D-galacturônico (monohidrato) e L-glucuno-1,4-lactona comercializadas pela Merck-Schuchardt. Estas substâncias, mantidas previamente em dessecador a vácuo por 48 h, foram pesadas (1 mg de cada padrão) e submetidas ao processo de derivação em seus respectivos alditóis acetatos. Para tanto, todos os açúcares neutros e os aminoaçúcares foram submetidos às etapas de redução com borohidreto de sódio, descrita no item 3.8.2.1.2., e à de acetilação (item 3.8.2.1.6.). As lactonas foram submetidas às etapas de redução com borohidreto de sódio, descrita no item 3.8.2.1.5., e à de acetilação (3.8.2.1.6.). O ácido D-galacturônico foi submetido às etapas descritas nos itens 3.8.2.1.2, 3.8.2.1.4., 3.8.2.1.5. e 3.8.2.1.6.

3.8.2.2. Preparo das colunas cromatográficas

Para a separação dos alditóis acetatos, obtidos conforme descrito no item 3.8.2.1., foi utilizada uma fase estacionária líquida consistindo de, etileno glicol adipato (EGA) 0,2% (Applied Science Labs. Inc., Pennsylvania, USA), etileno glicol succinato (EGS) 0,2% (Appl. Sci. Labs. Inc.) e óleo de silicone XF-1150 0,4% (Appl. Sci. Labs. Inc.), im-

pregnada no suporte Chromosorb W HP (100-120 mesh) (Supelco, Inc.). Este material, utilizado para a separação cromatográfica, foi introduzido em duas colunas de aço inoxidável (Premium Grade, Supelco, Inc.) possuindo um comprimento de 2m cada e diâmetros externos e internos de 3,17 mm e 2,1 mm, respectivamente. Para o preparo da fase estacionária e para o empacotamento das colunas, procedeu-se como se segue:

Para o preparo da fase estacionária, 100 mg de EGS foram dissolvidas em 25 ml de clorofórmio P.A. e 100 mg de EGA, acrescidas de 200 mg de XF-1150, foram dissolvidas em 25 ml de acetona P.A. Em seguida as duas soluções foram simultaneamente despejadas sobre 10 g do suporte Chromosorb W HP, previamente pesadas em um Becker de 250 ml. A suspensão foi agitada suavemente com uma espátula e submetida, em seguida, a uma desgaseificação (5 min) em um dessecador, a vácuo. A mistura foi, então, submetida a mais duas agitações suaves intercaladas por um período de repouso de 15min, após o que sofreu nova agitação e decantação por ca. de 20s, para eliminação do excesso de solvente juntamente com as partículas menores. Em seguida a suspensão foi filtrada a vácuo em sílica porosa e o material, ainda úmido, foi transferido para uma cápsula de porcelana e submetido à secagem em estufa a 45°C, com revolvimentos periódicos do mesmo, com auxílio de uma espátula.

Duas colunas de aço inoxidável (2m x 3,17 mm d.e.), previamente confeccionadas conforme o usual, foram la

vadas sequencialmente, a vácuo, com 100 ml de cada um dos solventes: água bidestilada, metanol, acetona e clorofórmio. Em seguida, 50 mg de EGS foram dissolvidas em 12,5 ml de clorofórmio e 50 mg de EGA, acrescidas de 100 mg de XF-1150, foram dissolvidas em 12,5 ml de acetona. As duas soluções obtidas foram reunidas e as colunas foram preenchidas com a mistura. Após alguns segundos, o líquido foi entornado e o resíduo do mesmo retirado com auxílio de vácuo brando, sendo, então, as colunas submetidas à secagem em estufa a 100°C por 2 h. Após este tratamento as colunas foram empacotadas por vibração, a vácuo, com o suporte impregnado com a fase estacionária, conforme procedimento usual.

3.8.2.3. Separação e análise das amostras

Para a separação e análise dos alditóis acetatos presentes nas amostras foi empregado o cromatógrafo a gás Varian modelo 3.700 (Varian Aerograph, California, USA) acoplado a um integrador Shimadzu Chromatopac C-R1B (Shimadzu Corporation Analytical Instrument Plant, Kyoto, Japan). As colunas cromatográficas preparadas conforme descrito no item 3.8.2.2., foram previamente condicionadas por 48 h a 190°C, sob um fluxo de nitrogênio de 10 ml/min, antes de serem utilizadas para a análise. Uma das colunas foi empregada para a análise, sendo que a outra, de referência, foi utilizada como balanceadora para compensar eventuais perdas de fase

líquida. Dois detectores de ionização de chama foram operados utilizando-se os gases ar sintético e hidrogênio. Como gás de arraste foi empregado o nitrogênio. O eletrômetro foi ajustado para uma amplitude de sinal de 10^{-10} amperes /mili-volts com uma atenuação igual a 16.

As frações contendo os alditóis acetatos, obtidos conforme descrito no item 3.8.2.1., foram dissolvidas em acetona em volumes variando de 10 a 30 μ l, sendo que as amostras contendo os padrões foram dissolvidas em um volume de 200 μ l. Em seguida, alíquotas de 1 μ l, foram injetadas na coluna com uma seringa Hamilton de 5 μ l (7005N - Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland). Os alditóis acetatos puderam ser separados utilizando-se o seguinte programa de temperatura: injeção das amostras na coluna a uma temperatura inicial de 160°C. Após um intervalo de 7 min, a temperatura foi aumentada a razão de 2°C/min de 160 a 195°C, permanecendo em 195°C por 4 ou 25 min para detecção dos açúcares neutros e aminoaçúcares, respectivamente. As temperaturas dos injetores e dos detectores foram de 230°C e de 240°C, respectivamente. O fluxo do gás de arraste (N₂) empregado foi de 30 ml/min. Os fluxos dos gases hidrogênio e ar sintético foram iguais a 30 e 300 ml/min, respectivamente.

Os dados são apresentados como porcentagem em massa da composição de açúcares a partir dos valores integrais das áreas obtidas para cada pico respectivo. O método empregado para o cálculo da composição quantitativa das

amostras, a partir dos cromatogramas obtidos, foi o de normalização de área. Para a identificação dos resíduos de açúcares presentes nas amostras foram utilizados os padrões mencionados no item 3.8.2.1.

3.8.3. Tratamentos efetuados com o elicitor de

H. vastatrix

3.8.3.1. Tratamento com metaperiodato de sódio

A fração obtida na última etapa de purificação da preparação FEA (item 3.5.4.) foi submetida a um tratamento com metaperiodato de sódio segundo metodologia descrita por AYERS et alii (1976b) e por SPIRO (1966), com modificações. As frações obtidas após este tratamento foram submetidas ao bioensaio em cotilêdones de soja para a determinação de suas atividades elicitoras da síntese de gliceolina, conforme metodologia descrita no item 3.3. A utilização desta técnica teve por objetivo verificar a sensibilidade do elicitor à oxidação com metaperiodato de sódio e consequentemente o efeito deste tratamento sobre a atividade elicitora.

Para tanto, alíquotas de 3 ml da fração elicitora contendo 148 Eq μ g de manose totais, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas respectivamente em 1 ml de solução aquosa de metaperiodato de sódio (Sigma Chem. Co.) 15 mM (pH 5,0). A mistura foi incubada a 20 °C por 45 h no escuro. Após a reação, o excesso de metaperiodato foi consumido pela

adição de 200 µl de etileno glicol (Merck) a cada amostra. Foram preparados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados no processo (**Controle-PE**) e o outro consistindo em uma fração elicitora igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que o metaperiodato foi pré-tratado com o etileno glicol antes de ser adicionado à fração (**FEA-PE-Controle**). As amostras tratadas com metaperiodato, designadas por **FEA-PE-Tratada**, e as amostras controle foram dialisadas contra uma solução de cloreto de sódio 0,1M (15h) e em seguida contra água bidestilada (24 h), efetuando-se duas trocas de água. A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 2.000 daltons. As frações, retidas no interior das membranas de diálise, foram respectivamente diluídas com água bidestilada estéril para um volume de 3 ml cada. Uma das amostras tratadas com periodato e dialisadas (**FEA-PE-Tratada**) foi submetida à redução com borohidreto de sódio e a uma posterior hidrólise ácida fraca com ácido sulfúrico 0,05N. Para tanto, foram adicionados à amostra 400 µl de uma solução 1% de borohidreto de sódio em hidróxido de amônio 1N. A mistura foi incubada por 2 h à temperatura ambiente e em seguida por 12 h a 4°C. O pH da amostra foi ajustado para 5,0, adicionando-se, à mesma, gotas de ácido acético glacial. A fração foi dialisada contra uma solução de cloreto de sódio 0,1M (12 h) e em seguida contra água bidestilada (48 h), efetuando-se duas trocas de

água. A diálise foi feita nas mesmas condições descritas previamente. Em seguida, a fração retida no interior da membrana de diálise, foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico 0,05N a 80°C por 1 h. A amostra foi então neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1N e submetida à secagem a 40°C em rotoevaporador a vácuo. O resíduo foi dissolvido em 3 ml de água bidestilada estéril, sendo que a fração obtida foi designada por **FEA-PE-Hidrolisada**. Foi preparado um controle contendo apenas os reagentes utilizados no processo (**Controle-PE-H**).

As frações **FEA-PE-Tratada**, **FEA-PE - Controle**, **FEA-PE-Hidrolisada**, **Controle-PE** e **Controle-PE-H** foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3.) e ao teste de antrona (item 3.8.1.) para determinação respectivamente da atividade elicitora da síntese de gliceolina e da concentração de carboidratos.

3.8.3.2. Tratamento com pronase

Com a finalidade de verificar a sensibilidade do elicitor ao tratamento com pronase e consequentemente o efeito desta enzima sobre a atividade elicitora, a fração obtida pelo tratamento da preparação FEA com etanol a 80% (**FEA-80**) foi submetida a um tratamento com pronase, segundo metodologia descrita por SPIRO (1972) e AYERS et alii (1976c). A fração obtida após este tratamento foi submetida ao bioen-

saio em cotilédones de soja para a determinação de sua atividade elicitora da síntese de gliceolina, conforme metodologia descrita no item 3.3.

Para tanto, alíquotas de 3 ml da fração FEA-80 contendo cada uma 174 Eq µg SAB totais, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas respectivamente em 2,95 ml de tampão PBS 10mM, pH 7,2. Em seguida foram adicionados a uma das frações 50 µl de uma solução 0,01% de pronase (extraída de *Streptomyces griseus*, Koch-Light Labs. Ltd. - Colnbrook, England) no mesmo tampão e 3-4 gotas de toluol. A amostra foi incubada a 37°C por 24 h e em seguida submetida à fervura por 10 min. A fração foi, então, centrifugada a 2.500 g por 10 min. O sedimento foi descartado e o volume do sobrenadante foi completado com água bidestilada estéril para 3 ml. Esta fração foi designada por FEA-80-Pronase-T. Foram preparados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados no processo (**Controle-Pronase**) e o outro consistindo em uma fração FEA-80 igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão PBS 10 mM, pH 7,2, ao invés da enzima (FEA-80-Pronase-C).

As frações FEA-80-Pronase-T, FEA-80-Pronase-C e **Controle-Pronase** foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) para determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina.

3.8.3.3. Tratamentos com glicosidases

Tendo por objetivo verificar a sensibilidade do elicitor aos tratamentos com as glicosidases α -manosidase, β -galactosidase e β -glucosidase, e consequentemente o efeito destas enzimas sobre a atividade elicitora, alíquotas da fração, obtida na última etapa de purificação da preparação FEA (item 3.5.4.), foram submetidas a tratamentos com as mesmas, segundo metodologias descritas por SPIRO (1966) e LI & LI (1972). As frações obtidas após estes tratamentos foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja para a determinação de suas atividades elicitoras da síntese de gliceolina, conforme metodologia descrita no item 3.3. As atividades das enzimas utilizadas foram comprovadas através de ensaios prévios com os respectivos substratos.

3.8.3.3.1. Tratamento com α -manosidase

Para tanto, alíquotas de 3 ml da fração elicitora contendo cada uma 148 μ g de carboidrato totais, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas respectivamente em 1 ml de tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,6. Em seguida foram adicionados a uma das frações 15 μ l de uma solução de α -manosidase (exoglicosidase comercial, tipo III, extraída de *Canavalia ensiformis*, Sigma Chem. Co.) e 3 gotas de toluol. A amostra foi incubada a 25°C por 44 h e em seguida submetida à fervura por 5 min. A fração foi então centrifugada a 2.500 g por 10 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi dialisado contra água bidestilada (72h), efe-

tuando-se quatro trocas de água. A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 2.000 daltons. O volume da fração, retida no interior da membrana de diálise, foi ajustado para 3 ml com água bi-destilada estéril. Esta fração foi designada por FEA- α -manosidase-Tratada. Foram preparados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados no processo (Controle- α -manosidase) e o outro consistindo em uma fração elicitora igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,6, ao invés da enzima (FEA- α -manosidase-Controle).

As frações FEA- α -manosidase-Tratada, FEA- α -manosidase-Controle e Controle- α -manosidase foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3) e ao teste de antrona (item 3.8.1.) para determinação respectivamente da atividade elicitora da síntese de gliceolina e da concentração de carboidratos.

3.8.3.3.2. Tratamento com β -galactosidase

Para tanto, alíquotas de 3 ml da fração elicitora contendo cada uma 148 μ g de carboidrato totais, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas respectivamente em 1ml de tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,0. Em seguida, foram adicionados a uma das frações, 15 μ l de uma solução de β -galactosidase (exoglicosidase comercial, grau V, extraída de

Aspergillus niger, Sigma Chem. Co.) e 3 gotas de toluol. A amostra foi incubada a 25°C por 44 h e em seguida submetida à fervura por 5 min. A fração foi então centrifugada a 2.500 g por 10 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi dialisado contra água bidestilada (72 h), efetuando-se quatro trocas de água. A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 2.000 daltons. O volume da fração, retida no interior da membrana de diálise, foi ajustado para 3 ml com água bidestilada estéril. Esta fração foi designada por **FEA-β-galactosidase-Tratada**. Foram preparados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados no processo (**Controle-β-galactosidase**) e o outro consistindo em uma fração elicitora igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,0, ao invés da enzima (**FEA-β-galactosidase-Controle**).

As frações **FEA-β-galactosidase-Tratada**, **FEA-β-galactosidase-Controle** e **Controle-β-galactosidase** foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3.) e ao teste de antrona (item 3.8.1) para determinação respectivamente da atividade elicitora da síntese de gliceolina e da concentração de carboidratos.

3.8.3.3.3. Tratamento com β-glucosidase

Para tanto, alíquotas de 3 ml da fração eli-

citora contendo cada uma 148 μ g de carboidrato totais, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas respectivamente em 1 ml de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,2. Em seguida, foram adicionados a uma das frações 70 μ l de solução de β -glucosidase em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,2 (15 mg enzima/ml de tampão) (exoglicosidase comercial, isolada de amendoas, Sigma Chem. Co.) e 3 gotas de toluol. A amostra foi incubada a 37°C por 44 h e em seguida submetida à fervura por 5 min. A fração foi então centrifugada a 2.500 g por 10 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi dialisado contra água bidestilada (72 h), efetuando-se quatro trocas de água. A diálise foi feita sob agitação e a 4°C, utilizando-se membranas Spectrapor com capacidade de excluir moléculas com pesos moleculares menores que 2.000 daltons. O volume da fração, retida no interior da membrana de diálise, foi ajustado para 3 ml com água bidestilada estéril. Esta fração foi designada por **FEA- β -glucosidase-Tratada**. Foram preparados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados no processo (**Controle- β -glucosidase**) e o outro consistindo em uma fração elicitora igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,2, ao invés da enzima (**FEA- β -glucosidase-Controle**).

As frações **FEA- β -glucosidase-Tratada**, **FEA- β -glucosidase-Controle** e **Controle- β -glucosidase** foram submetidas ao bioensaio em cotilédones de soja (item 3.3.) e ao tes

te de antrona (item 3.8.1) para determinação respectivamente da atividade elicitora da síntese de gliceolina e da concentração de carboidratos.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os bioensaios em cotilédones de soja, os testes químicos e as análises em cromatografia em fase gasosa foram repetidos pelo menos três vezes em cada experimento e todos os experimentos foram repetidos duas vezes no mínimo. Os resultados dos bioensaios foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias do tratamento e do controle foram testadas quanto à significância empregando-se o teste-t de Student a $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. SELEÇÃO DA VARIEDADE DE SOJA EMPREGADA PARA OS BIOENSAIOS

Através dos bioensaios efetuados com cotilédones de soja, empregando-se as variedades IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina, foi possível verificar que as duas variedades mais adequadas quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e quanto à uniformidade de resposta em presença da fração LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* foram a IAC-8 e a Cristalina (Tabela 1). Embora a variedade Cristalina tenha se mostrado bastante sensível quanto à capacidade de resposta em presença do elicitor de *S. cerevisiae*, IAC-8 foi a variedade selecionada para os bioensaios subsequentes, por apresentar uma resposta mais homogênea. As variedades IAC-7, IAC-11 e IAC-12 sintetizaram concentrações menores de gliceolina em resposta a fração LEV-SD quando comparadas com a IAC-8 e a Cristalina, sendo que a

Tabela 1. Bioensaios efetuados com cotilédones de soja empregando-se as variedades IAC-7, IAC-8, IAC-11, IAC-12 e Cristalina e a fração elicitora LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* ¹

Variedade	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	
	Controle	Tratamento
IAC-7	0,120 ± 0,040	0,405* ± 0,079
IAC-8	0,250 ± 0,023	1,022* ± 0,049
IAC-11	0,131 ± 0,012	0,544* ± 0,071
IAC-12	0,138 ± 0,011	0,478* ± 0,089
Cristalina	0,296 ± 0,025	1,132* ± 0,149

¹ Média de três experimentos com duas réplicas cada (± erro padrão).

² É considerado como atividade elicitora o valor A_{285nm}, segundo AYERS et alii (1976c). Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% (P < 0,05) (teste-t).

Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril. Tratamento: cotilédones tratados com a fração elicitora diluída com água bidestilada estéril, possuindo uma concentração igual a 418 Eq µg de manose/ml.

IAC-11 mostrou-se inadequada pois os seus cotilédones apresentaram intensa necrose após o período de incubação com o elicitor.

Os cotilédones de soja, quando tratados com substâncias ativas como elicitores da síntese de fitoalexinas, apresentam uma coloração vermelha característica devido à presença de um composto não identificado, que é sintetizado paralelamente à gliceolina (ALBERSHEIM & VALENT, 1978). Apesar da formação desta substância não estar diretamente relacionada à síntese da fitoalexina, serve como indicador da resposta bioquímica dos tecidos à presença de elicitores, uma vez que a intensidade da coloração vermelha é aproximadamente proporcional à concentração de gliceolina sintetizada (ALBERSHEIM & VALENT, 1978). Esta mesma coloração típica foi também observada nos bioensaios efetuados (Figura 1).

4.2. TESTES QUÍMICOS EFETUADOS COM A PREPARAÇÃO BRUTA DE *H. vastatrix*

Os testes químicos efetuados com a preparação bruta de uredíniosporos de *H. vastatrix*, FEA, na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos por ml, revelaram a presença, nesta fração, de uma proporção de 42,04% de carboidratos para 57,96% de proteínas (Tabela 2).

Figura 1. Bioensaio com cotilédones de soja empregando-se a variedade IAC-8 e como elicitor a fração LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae*.

C - Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril e incubados por 20h a 26°C no escuro.

T - Tratamento: cotilédones tratados com a fração elicitora na concentração de 418 Eq μg de manose/ml e incubados por 20h a 26°C no escuro.

Tabela 2. Concentração de carboidratos e proteínas totais na preparação bruta de *H. vastatrix*.¹

Amostra ²	Carboidratos ³ (Eq µg manose/ml)	Proteínas ⁴ (Eq µg SAB/ml)	Carboidratos (% na fração)	Proteínas (% na fração)
FEA	781,90	1077,82	42,04	57,96

¹ Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com três réplicas cada.

² Preparação bruta FEA na concentração equivalente a 40mg de urediniosporos de *H. vastatrix* por ml.

³ Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antrona.

⁴ Concentração protéica determinada pelo teste de Lowry.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ELICITORA DA SÍNTESE DE GLICEOLINA DA PREPARAÇÃO BRUTA DE *H. vastatrix*

Os resultados dos bioensaios com cotilédones de soja empregando-se a variedade IAC-8 e diferentes concentrações da preparação FEA, são apresentados na Tabela 3. Esses resultados revelaram que o filtrado aquoso bruto de urediniosporos autoclavados de *H. vastatrix* foi capaz de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina nestes tecidos. A atividade elicitora da preparação bruta de *H. vastatrix* pôde ser detectada quando foram utilizadas concentrações desta fração equivalentes a 400 e 800 Eq µg de manose por ml. A maior atividade elicitora foi detectada na fração FEA na concentração de 800 Eq µg de manose por ml, sendo equivalente àquela apresentada pela fração LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* (418 Eq µg de manose/ml), utilizada como controle da síntese de fitoalexina nestes bioensaios.

4.4. PURIFICAÇÃO DO ELICITOR DE *H. vastatrix*

4.4.1. Testes químicos efetuados com as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de *H. vastatrix* com etanol

Os testes químicos efetuados com todas as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações da preparação bruta de *H. vastatrix* na atividade elicitora da síntese de gliceolina em cotilédones de soja.¹

Preparação	Atividade elicitora ³ (A _{285nm})
FEA (100 Eq µg manose/ml)	0,217 ± 0,024
FEA (200 Eq µg manose/ml)	0,311 ± 0,051
FEA (400 Eq µg manose/ml)	0,543*± 0,064
FEA (800 Eq µg manose/ml)	0,997*± 0,007
LEV-SD (418 Eq µg manose/ml)	0,912*± 0,073
Controle ²	0,244 ± 0,014

¹ Média de três experimentos com três réplicas cada (± erro padrão).

² Controle = cotilédones tratados com água bidestilada estéril.

³ Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% (P < 0,05) (teste-t).

bruta FEA com etanol revelaram a presença de carboidratos e proteínas, em diferentes concentrações para cada uma das frações obtidas (Tabela 4). A fração FEA-Sn apresentou as maiores concentrações de proteínas (90,38%) e de carboidratos (47,60%) em relação aos totais recuperados, sendo que quase a totalidade das proteínas detectadas na preparação bruta FEA permaneceram nesta fração (FEA-Sn), obtida na última etapa do tratamento com etanol. Abaixo desta, as frações FEA-60 e FEA-80, resultantes da precipitação etanólica fracionada do FEA a 60 e 80%, respectivamente, foram as que apresentaram, em relação às demais, as maiores concentrações tanto de carboidratos como de proteínas, tendo, entretanto, cada fração, maior concentração de carboidratos que proteínas.

4.4.2. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da precipitação etanólica fracionada

Os bioensaios com cotilédones de soja efetuados empregando-se a variedade IAC-8 e as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de *H. vastatrix* (FEA) com etanol, são apresentados na Tabela 5. Foi verificado que somente as frações FEA-60 e FEA-80, foram capazes de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina nos tecidos de soja. A fração FEA-80, resultante da precipitação etanólica fracionada do FEA a 80%, se mostrou 387,4% mais ativa do que a fração FEA-60. A fração FEA-80 apresentou tam

Tabela 4. Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de *H. vastatrix* com etanol.¹

Frações ²	Carboidratos ³ (Eq µg manose/ml)	Proteínas ⁴ (Eq µg SAB/ml)	Carboidratos ⁵ (%)	Proteínas ⁵ (%)
FEA-20	8,05	11,00	1,01	1,05
FEA-40	19,13	9,00	2,40	0,86
FEA-60	206,38	30,00	25,91	2,87
FEA-80	183,89	50,49	23,08	4,83
FEA-Sn	379,20	944,63	47,60	90,38

¹ Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com três réplicas cada.

² Todas as frações foram submetidas aos testes químicos na concentração equivalente a 40 mg de urediniosporos de *H. vastatrix* por ml.

³ Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antro-na.

⁴ Concentração de proteínas determinada pelo teste de Low-ry.

⁵ % de carboidratos e proteínas em cada fração em relação aos totais recuperados.

Tabela 5. Bioensaios com cotilédones de soja e as frações resultantes da precipitação fracionada da preparação bruta de *H. vastatrix* com etanol ¹

Frações ²	Atividade elicitora ³ (A _{285nm})
FEA-20	0,103 ± 0,022
FEA-40	0,091 ± 0,009
FEA-60	0,309* ± 0,042
FEA-80	1,197* ± 0,097
FEA-Sn	0,184 ± 0,022
LEV-SD	0,742* ± 0,020
Controle	0,136 ± 0,026

¹ Média de quatro experimentos com três réplicas cada ($\pm$ erro padrão).

² Todas as frações provenientes da precipitação fracionada do FEA com etanol foram submetidas aos bioensaios na concentração equivalente a 40 mg de urediniosporos de *H. vastatrix* por ml. A fração elicitora LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* foi utilizada na concentração de 418 Eq μ g de manose por ml. Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril.

³ Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% ($P < 0,05$) (teste-t).

bém uma atividade elicitora 161,3% maior do que aquela encontrada para a fração LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* (418 Eq μ g de manose/ml), utilizada como controle da síntese de fitoalexina nestes bioensaios. Como a maior atividade elicitora foi detectada na fração FEA-80, deu-se prosseguimento à purificação do elicitor de *H. vastatrix*, submetendo-se esta preparação à cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B.

4.4.3. Cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B

A Figura 2 representa o fracionamento da amostra FEA-80 (19,31 Eq mg manose totais e 5,30 Eq mg SAB totais), obtida pela precipitação etanólica fracionada da preparação bruta FEA a 80%, através de cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B. As frações de n^os 1 a 45 e as de n^os 46 a 87 foram obtidas, respectivamente, pela eluição da coluna com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2 e com o mesmo tampão contendo 4% de metil- α -D-manopiranosídeo. As frações de n^os 46 a 87 não puderam ser submetidas ao teste de antrona para determinação direta do conteúdo de carboidratos, devido à presença nas mesmas do metil- α -D-manopiranosídeo. Os carboidratos detectados nas frações, obtidas pela eluição da coluna com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2, foram eluídos em um único pico, enquanto que as proteínas detectadas nestas fra-

Figura 2. Cromatografia de afinidade da fração FEA-80 em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B.

A seta indica o início da eluição com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2 contendo 4% de metil- α -D-manopiranosídeo. As frações foram de 4,5 ml cada. Carboidratos (●—●), em equivalentes μ g de manose por ml e as proteínas (○—○), em equivalentes μ g de SAB por ml, foram medidos respectivamente pelos testes de antrona e de Lowry. As frações eluídas foram reunidas: n^os 4 a 13 (FEA-EI), n^os 14 a 45 (FEA-EIIa) e n^os 46 a 87 (FEA-EII).

ções e naquelas contendo 4% de metil- α -D-manopiranosídeo foram eluídas em diferentes picos. A combinação das frações se deu com base em sua afinidade pela lectina Concanavalina-A e de acordo com os picos de eluição dos carboidratos e proteínas detectados nas mesmas. Assim, as frações de n°s 4 a 13 (eluato I) e as de n°s 14 a 45 (eluato Ia), eluídas da coluna com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2 e que não apresentaram qualquer afinidade pela referida lectina, e as frações de n°s 46 a 87 (eluato II) eluídas com o mesmo tampão contendo 4% de metil- α -D-manopiranosídeo, e que possuíram conseqüentemente afinidade pela Concanavalina-A, foram respectivamente combinadas, dialisadas, concentradas e filtradas conforme descrito no item 3.5.2. As frações resultantes, possuindo uma concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml e um volume de 105 ml cada, foram denominadas de FEA-EI (eluato I), FEA-EIa (eluato Ia) e FEA-EII (eluato II).

4.4.4. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da cromatografia em Concanavalina-A Sepharose 4B

Os testes químicos efetuados com as frações FEA-EI, FEA-EIa e FEA-EII, resultante da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B encontram-se expressos na Tabela 6. Os resultados revelaram que foram recuperados 81,10% do total em Eq de

Tabela 6. Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B ¹

Frações ²	Carboidratos ³	Proteínas ⁴	Carboidratos ⁵	Proteínas ⁵
	(Eq µg manose/ml)	(Eq µg SAB/ml)	(%)	(%)
FEA-EI	125,96	34,86	84,46	81,33
FEA-EIa	9,58	3,43	6,42	8,00
FEA-EII	13,60	4,57	9,12	10,66

¹ Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com três réplicas cada.

² Todas as frações foram submetidas aos testes químicos na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml.

³ Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antro-na.

⁴ Concentração de proteínas determinada pelo teste de Low-ry.

⁵ % de carboidratos e proteínas em cada fração em relação aos totais recuperados.

manose e 84,91% do total em Eq de SAB aplicados à coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B. Do total recuperado, 90,88 % dos carboidratos eluídos da coluna não possuem qualquer afinidade pela referida lectina. A maioria destes carboidratos, eluídos com o tampão PBS 0,02M, pH 7,2 (84,46%), foi recuperada na fração FEA-EI (Tabela 6). Os testes químicos indicaram, ainda, que 89,33% das proteínas, detectadas nas frações, foram eluídas com o mesmo tampão PBS, estando 81,33% das mesmas presentes na fração FEA-EI (eluato I). Aproximadamente, nas três frações, a proporção de proteínas para carboidratos em cada fração é da ordem de 1:3.

4.4.5. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da cromatografia em Concanavalina-A Sepharose 4B

Os bioensaios com cotilêdones de soja efetuados empregando-se as frações provenientes da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em coluna de Concanavalina -A Sepharose 4B, revelaram que somente a fração FEA-EI foi capaz de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina nos tecidos de soja (Tabela 7). Como a atividade elicitora foi detectada apenas na fração FEA-EI, deu-se prosseguimento à purificação do elicitor de *H. vastatrix*, submetendo-se esta preparação à cromatografia de troca iônica em DEAE - celulose.

Tabela 7. Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da cromatografia de afinidade da amostra FEA-80 em Concanavalina-A Sepharose 4B ¹

Frações ²	Atividade elicitora ³
	(A _{285nm})
FEA-EI	1,406* ± 0,074
FEA-EIa	0,215 ± 0,007
FEA-EII	0,218 ± 0,033
Controle	0,219 ± 0,020

¹ Média de quatro experimentos com duas réplicas cada (± erro padrão).

² Todas as frações foram submetidas aos bioensaios na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml. Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril.

³ Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% (P < 0,05) (teste-t).

4.4.6. Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

A Figura 3 representa o fracionamento da amostra FEA-EI (11,34 Eq mg manose totais e 3,14 Eq mg SAB totais), obtida na cromatografia de afinidade da fração FEA-80 em Concanavalina-A Sepharose 4B, através de cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose. As frações de n°s 1 a 21 e as de n°s 22 a 74 foram obtidas, respectivamente, pela eluição da coluna com o tampão PBS 5mM, pH 7,2 e com um gradiente linear de cloreto de sódio 0 a 0,5M preparado no mesmo tampão. Os carboidratos foram eluídos em dois picos distintos, sendo o primeiro detectado nas frações eluídas da coluna com o tampão inicial e o segundo nas frações eluídas, com o gradiente linear de cloreto de sódio. As concentrações máximas de carboidratos foram detectadas, respectivamente, nas frações de n°s 13 e 35 do primeiro e segundo pico de eluição, sendo iguais a 225,50 e 22,64 Eq µg de manose por ml. As proteínas foram detectadas principalmente nas frações eluídas da coluna, com o tampão inicial (frações n°s 7 a 16), estando presentes também naquelas eluídas com o gradiente linear de cloreto de sódio (frações n°s 67 e 68). As frações foram reunidas baseando-se em sua afinidade pelo trocador aniônico DEAE-celulose e de acordo com os picos de eluição dos carboidratos e proteínas detectados nas mesmas. Assim, as frações de n°s 6 a 21 (eluato A), eluídas da coluna com o tampão PBS 5 mM, pH 7,2, não apresentando portanto afinidade pelo referido tro

Figura 3. Cromatografia de troca aniônica da fração FEA-EI em coluna de DEAE-celulose.

A seta indica o início da aplicação do gradiente linear de cloreto de sódio 0 a 0,5M. As frações foram de 4,8 ml cada. Carboidratos (●—●), em equivalentes µg de manose por ml e as proteínas (○—○), em equivalentes µg de SAB por ml, foram medidos respectivamente pelos testes de antrona e de Lowry. As frações eluídas foram reunidas: n°s 6 a 21 (FEA-A), n°s 22 a 50 (FEA-B) e n°s 66 a 74 (FEA-C).

cador aniônico, e as frações de n°s 22 a 50 (eluato B) e de n°s 66 a 74 (eluato C), eluídas no gradiente linear de cloreto de sódio, possuindo consequentemente afinidade pela DEAE-celulose, foram respectivamente combinadas, dialisadas, concentradas e filtradas conforme descrito no item 3.5.3. As frações resultantes, possuindo uma concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix*, por ml e um volume de 90 ml cada, foram denominadas de FEA-A (eluato A), FEA-B (eluato B) e FEA-C (eluato C).

4.4.7. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da cromatografia em DEAE-celulose

Os resultados dos testes químicos efetuados com as frações FEA-A, FEA-B e FEA-C, resultantes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em coluna de DEAE-celulose são apresentados na Tabela 8 e revelaram que 74,75% do total em Eq de manose e 24,56% do total em Eq de SAB aplicados à coluna, foram recuperados. Do total recuperado, 87,16% dos carboidratos eluídos não possuem afinidade pelo referido trocador aniônico. Os carboidratos que apresentaram afinidade pela DEAE-celulose (12,83%), foram recuperados principalmente na fração FEA-B (10,72%). Os testes químicos indicaram, ainda, que as proteínas eluídas da coluna foram detectadas apenas na fração FEA-A, não apresentando portanto afinidade pelo trocador aniônico. A concentra-

Tabela 8. Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em coluna de DEAE-celulose ¹

Frações ²	Carboidratos ³	Proteínas ⁴	Carboidratos ⁵	Proteínas ⁵
	(Eq µg manose/ml)	(Eq µg SAB/ml)	(%)	(%)
FEA-A	82,10	8,57	87,16	100
FEA-B	10,10	0	10,72	0
FEA-C	1,99	0	2,11	0

¹ Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com três réplicas cada.

² Todas as frações foram submetidas aos testes químicos na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml.

³ Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antro-na.

⁴ Concentração de proteínas determinada pelo teste de Low-ry.

⁵ % de carboidratos e proteínas em cada fração em relação aos totais recuperados.

ção total de proteínas eluídas da coluna e presentes na fração FEA-A (0,77 Eq mg de SAB totais) representa uma recuperação de apenas 24,56% em relação ao total aplicado à coluna de DEAE-celulose (3,14 Eq mg de SAB totais). A fração FEA-A mostrou uma maior proporção de carboidratos do que proteínas, sendo aproximadamente da ordem de 10:1.

4.4.8. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da cromatografia em DEAE-celulose

Os resultados dos bioensaios com cotilédones de soja efetuados empregando-se as frações provenientes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em coluna de DEAE-celulose são apresentados na Tabela 9 e revelaram que as frações FEA-A e FEA-B foram capazes de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina nos tecidos de soja. Entretanto, a fração FEA-A, obtida pela eluição da coluna com o tampão PBS 5mM, pH 7,2 e não apresentando portanto afinidade pelo referido trocador aniônico, se mostrou 194,1% mais ativa do que a fração FEA-B, eluída no gradiente linear de cloreto de sódio. Como a maior atividade elicitora foi detectada na fração FEA-A, deu-se prosseguimento à purificação do elicitor de *H. vastatrix*, submetendo-se esta preparação à filtração em Bio-Gel P-60.

Tabela 9. Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da cromatografia de troca aniônica da amostra FEA-EI em DEAE-celulose ¹

Frações ²	Atividade elicitora ³ (A _{285nm})
FEA-A	1,114* $\pm$ 0,108
FEA-B	0,574* $\pm$ 0,031
FEA-C	0,323 $\pm$ 0,047
Controle	0,238 $\pm$ 0,022

¹ Média de três experimentos com três réplicas cada ($\pm$ erro padrão).

² Todas as frações foram submetidas aos bioensaios na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml. Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril.

³ Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% ($P < 0,05$) (teste-t).

4.4.9. Filtração em Bio-Gel P-60

A Figura 4 representa a determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i) eluídos da coluna de Bio-Gel P-60, utilizando-se respectivamente soluções feitas em tampão PBS 0,1M, pH 7,2, de "Blue dextran 2.000" (2 mg/ml) e de manose (1 mg/ml). O "Blue dextran" e a manose apresentaram máximos de eluição em 13,2 e 40,8 ml, respectivamente. A Figura 5 representa o fracionamento da amostra FEA-A (6,73 Eq mg manose totais e 0,70 Eq mg SAB totais), obtida na cromatografia de troca aniônica da fração FEA-EI em DEAE-celulose, através de filtração em Bio-Gel P-60. A concentração máxima de carboidratos foi detectada na fração de nº 10, correspondendo a um volume de eluição igual a 30 ml. As proteínas apresentaram um máximo de eluição nas frações de nºs 9 a 11, correspondendo a um volume de 27 a 33 ml. O fracionamento da amostra FEA-A, através da coluna de Bio-Gel P-60, evidenciou uma distribuição heterogênea em termos de tamanho molecular dos carboidratos presentes nesta fração. Os polissacarídeos, detectados nas frações de nºs 4 a 14, apresentaram uma faixa de volume de eluição de 12 a 42 ml, correspondendo a moléculas com tamanhos de 3.000 a mais de 60.000 daltons. As frações de nºs 4 a 7 (eluato 1) e as de nºs 8 a 12 (eluato 2), eluídas respectivamente nos volumes externo e interno, foram separadamente combinadas, dialisadas, concentradas e filtradas conforme descrito no

Figura 4. Determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i) eluídos da coluna de Bio-Gel P-60.

As frações foram de 3 ml cada. "Blue dextran 2000" (●—●) e manose (●---●) (μg por ml) determinados respectivamente pela absorbância a 340 nm e pelo teste de antrona.

Figura 5. Filtração da fração FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.

As setas indicam respectivamente os volumes externo (V_o) (13,2 ml) e interno (V_i) (40,8 ml), determinados experimentalmente. As frações foram de 3,0 ml cada. Carboidratos (●—●), em equivalentes μg de manose por ml e as proteínas (○—○), em equivalentes μg de SAB por ml, foram medidos respectivamente pelos testes de antrona e de Lowry. As frações eluídas foram reunidas: n^os 4 a 7 (FEA-P60-1) e n^os 8 a 12 (FEA-P60-2).

item 3.5.4. As frações resultantes, possuindo uma concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml e um volume de 82 ml cada, foram denominadas de FEA-P60-1 (eluato 1) e FEA-P60-2 (eluato 2).

4.4.10. Testes químicos efetuados com as frações provenientes da filtração em Bio-Gel P-60

Os resultados dos testes químicos efetuados com as frações FEA-P60-1 e FEA-P60-2, resultantes da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60, são apresentados na Tabela 10 e revelaram que 79,61% dos carboidratos eluídos da coluna possuem pesos moleculares menores que 60.000 daltons, estando presentes na fração FEA-P60-2. A concentração total de carboidratos eluídos da coluna e presentes nas frações FEA-P60-1 e FEA-P60-2 (5,08 Eq mg manose totais), representa uma recuperação de 75,48% em relação ao total aplicado à coluna de Bio-Gel P-60 (6,73 Eq mg manose totais). Os testes químicos indicaram, ainda, que as proteínas eluídas da coluna foram detectadas apenas na fração FEA-P60-2 (0,63 Eq mg SAB totais), representando uma recuperação de 90% em relação ao total aplicado à coluna de Bio-Gel P-60 (0,70 Eq mg SAB totais). A fração FEA-P60-2 mostrou uma maior proporção de carboidratos do que proteínas, sendo da ordem de 6:1, aproximadamente.

Tabela 10. Concentração de carboidratos e proteínas totais nas frações provenientes da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60 ¹

Frações ²	Carboidratos ³	Proteínas ⁴	Carboidratos ⁵	Proteínas ⁵
	(Eq µg manose/ml)	(Eq µg SAB/ml)	(%)	(%)
FEA-P60-1	12,63	0	20,39	0
FEA-P60-2	49,30	7,71	79,61	100

¹ Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com três réplicas cada.

² As frações foram submetidas aos testes químicos na concentração equivalente a 40 mg de urediniosporos de *H. vastatrix* por ml.

³ Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antro-na.

⁴ Concentração de proteínas determinada pelo teste de Low-ry.

⁵ % de carboidratos e proteínas em cada fração em relação aos totais recuperados.

4.4.11. Determinação da atividade elicitora da síntese de gliceolina das frações provenientes da filtração em Bio-Gel P-60

Os bioensaios com cotilédones de soja efetuados empregando-se as frações provenientes da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60, revelaram que apenas a fração FEA-P60-2, eluída no volume interno, foi capaz de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina nos tecidos de soja (Tabela 11).

4.5. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ELICITORA DA SÍNTESE DE GLICEOLINA DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DE *H. vastatrix*

Conforme se verifica na Tabela 12, nos bioensaios com cotilédones de soja efetuados empregando-se a preparação bruta FEA de *H. vastatrix*, bem como as frações subsequentes resultantes de sua purificação, as atividades elicitoras, respectivamente obtidas, não foram as mesmas. Assim, o procedimento descrito por AYERS et alii (1976a) (item 3.6) foi empregado para comparar as atividades elicitoras da síntese de gliceolina das várias frações obtidas durante o isolamento do elicitor proveniente de *H. vastatrix* e presente na preparação FEA. As atividades elicitoras relativas da síntese de gliceolina das frações foram calculadas (item 3.6.) e em seguida normalizadas para a atividade da fração elicitó

Tabela 11. Bioensaios com cotilédones de soja e as frações provenientes da filtração da amostra FEA-A em Bio-Gel P-60 ¹

Frações ²	Atividade elicitora ³ (A _{285nm})
FEA-P60-1	0,352 ± 0,045
FEA-P60-2	1,012* ± 0,078
Controle	0,249 ± 0,025

¹ Média de quatro experimentos com duas réplicas cada (± erro padrão).

² As frações foram submetidas aos bioensaios na concentração equivalente a 40 mg de uredíniosporos de *H. vastatrix* por ml. Controle: cotilédones tratados com água bidestilada estéril.

³ Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5% (P < 0,05) (teste-t).

Tabela 12. Atividades elicitoras relativas da síntese de gliceolina da preparação FEA de *H. vastatrix* e das frações subsequentes resultantes de sua purificação.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	Carboidratos ³ (Eq µg manose/ml)	Atividade elicitora ⁴ relativa
FEA	0,997 ± 0,007	781,90	6
FEA-80	1,197 ± 0,097	183,89	32
FEA-EI	1,406 ± 0,074	125,96	54
FEA-A	1,114 ± 0,108	82,10	66
FEA-P60-2	1,012 ± 0,078	49,30	100

¹ Todas as frações foram submetidas aos bioensaios e aos testes químicos na concentração equivalente a 40 mg de urediniosporos de *H. vastatrix* por ml.

² Atividades elicitoras (± erro padrão) determinadas através de bioensaios com cotilédones de soja, variedade IAC-8.

³ Concentração de carboidratos em cada fração determinada pelo teste de antrona.

⁴ Calculado conforme AYERS et alii (1976a). Um valor de A_{285nm} = 0,5 foi escolhido como ponto de comparação. Atividades elicitoras relativas das frações foram normalizadas para a atividade da amostra FEA-P60-2.

ra mais pura, FEA-P60-2. Pode-se observar que a atividade elicitora relativa foi gradativamente aumentada durante o processo de purificação do elicitor proveniente de *H. vastatrix*. A fração mais pura, FEA-P60-2, mostrou possuir uma atividade elicitora relativa cerca de 17 vezes maior do que aquela apresentada pelo filtrado aquoso bruto de uredíniosporos autoclavados de *H. vastatrix* (FEA).

4.6. EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ELICITOR DE *H. vastatrix* NA ATIVIDADE ELICITORA

A Figura 6 representa o efeito da variação da concentração do elicitor de *H. vastatrix* na atividade elicitora. Diferentes concentrações da fração elicitora mais pura, FEA-P60-2, obtida na última etapa do fracionamento da preparação FEA, foram submetidas a bioensaios com cotilédones de soja (item 3.7). Os valores obtidos para as respectivas atividades elicitoras ($A_{285\text{nm}}$) foram descontados do valor médio de $A_{285\text{nm}}$ do controle (cotilédones tratados com água bidestilada estéril). Pode-se verificar que a atividade elicitora aumentou quando concentrações crescentes do elicitor de *H. vastatrix* foram aplicadas por cotilédone.

Figura 6. Bioensaios com cotilédones de soja efetuados com a variedade IAC-8 e diferentes concentrações da fração elicitora FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação FEA.

O valor médio de A_{285nm} obtido para o controle (cotilédones de soja tratados com água bidestilada estéril) foi igual a 0,225, sendo subtraído das atividades elicitoras obtidas para cada concentração da fração FEA-P60-2. A concentração de carboidratos foi determinada pelo teste de antrona. Cada ponto da curva representa a média de dois experimentos. Os dados obtidos foram submetidos à regressão curvilínea. S_e = erro-padrão da estimativa. R^2 = coeficiente de determinação.

4.7. ESTUDOS SOBRE A NATUREZA QUÍMICA DO ELICITOR DE *H. vastatrix*

4.7.1. Cromatografia em fase gasosa

As análises efetuadas, através de cromatografia em fase gasosa, dos derivados alditóis acetatos dos carboidratos presentes na preparação elicitora bruta FEA de *H. vastatrix*, revelaram como principais componentes a arabinose (59,59%) e a manose (34,15%), seguidos pela glucose (5,54%) e a galactose (0,72%) (Tabela 13, Figura 7). Entretanto, as frações FEA-80, FEA-EI e FEA-A, resultantes respectivamente da purificação do elicitor de *H. vastatrix* através da precipitação etanólica fracionada a 80%, cromatografia de afinidade em Concavanalina-A e cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose, revelaram possuir como principal componente a manose, seguida pela galactose e glucose, sendo a arabinose, o componente detectado em menor concentração nestas amostras. A fração elicitora mais pura, FEA-P60-2, obtida na última etapa do fracionamento da preparação FEA através da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60, mostrou possuir como principal açúcar componente, a manose (88,77%), seguida pela glucose (6,67%) e galactose (4,56%), sendo que a arabinose não foi mais detectada nesta fração. A FEA-P60-1, eluída no volume externo da coluna de Bio-Gel P-60 e não apresentando atividade elicitora, mostrou possuir como

Tabela 13. Composição dos açúcares neutros da preparação elicitora bruta FEA de *H. vastatrix* e das frações subsequentes resultantes de sua purificação.

Fração elicitora	Composição dos açúcares neutros ¹			
	Arabinose	Manose	Galactose	Glucose
FEA	59,59	34,15	0,72	5,54
FEA-80	7,96	70,62	12,43	8,99
FEA-EI	0,92	78,13	14,26	6,69
FEA-A	3,71	70,44	14,33	11,52
FEA-P60-2	0,00	88,77	4,56	6,67

¹ Porcentagem em massa da composição dos açúcares, determinada pelo método do alditol acetato e calculada pela normalização dos valores integrados das áreas obtidas para cada pico respectivo. Média de quatro repetições.

Figura 7. Cromatogramas dos derivados alditóis acetatos dos carboidratos presentes na preparação bruta FEA e nas diferentes frações resultantes de sua purificação.

(a) FEA, (b) FEA-80, (c) FEA-80-EI, (d) FEA-A, (e) FEA-P60-2, (f) FEA-B, (g) FEA-EII, (h) FEA-P60-1.

(1) arabinose, (2) manose, (3) galactose, (4) glucose, (5) inositol (referência).

principal componente a galactose (61,74%), seguida de manose (31,13%) e de glucose (7,13%). A fração FEA-EII, contendo carboidratos, que possuíram afinidade pela lectina Concanavalina-A, e não apresentando qualquer atividade elicitora, mostrou possuir apenas uma pequena concentração de manose. A análise da composição dos resíduos de açúcar presentes na fração FEA-B, proveniente da cromatografia de troca aniônica e possuindo uma atividade elicitora cerca de 1,9 vezes menor que aquela apresentada pela amostra FEA-A, revelou como principal componente a manose (69,84%), seguida pela galactose (20,88%) e a glucose (9,28%). Não foi detectada a presença de ácidos urônicos, nem tampouco de glucosamina e galactosamina em qualquer uma das amostras analisadas.

4.7.2. Tratamentos efetuados com o elicitor de

H. vastatrix

4.7.2.1. Tratamento com metaperiodato de sódio

O tratamento com metaperiodato de sódio da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA, levou a uma perda quase completa da atividade elicitora (94,63%) e a uma diminuição do conteúdo de carboidratos (45,33%) na amostra tratada (FEA-PE-Tratada) (Tabela 14). Entretanto, quando a amostra tratada com periodato, FEA-PE-Tratada, foi submetida a uma redução com borohidreto de sódio e a uma posterior hidrólise ácida fraca, ocor

Tabela 14. Efeito do tratamento com metaperiodato de sódio sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA através da filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	Carboidratos ³ (Eq µg manose/ml)
FEA-PE-Controle	0,774* ± 0,044	42,80
FEA-PE-Tratada	0,316 ± 0,065	23,40
Controle-PE	0,290 ± 0,049	0
FEA-PE-Hidrolisada	0,324* ± 0,028	15,10
Controle-PE-H	0,167 ± 0,002	0

¹ FEA-PE-Controle: fração FEA-P60-2 à qual foi adicionado metaperiodato de sódio pré-tratado com etileno glicol. FEA-PE-Tratada: fração FEA-P60-2 tratada com metaperiodato de sódio. Controle-PE: controle contendo apenas os reagentes utilizados no tratamento com metaperiodato.

FEA-PE-Hidrolisada: fração FEA-P60-2 tratada com metaperiodato, seguido de redução com borohidreto de sódio e hidrólise ácida fraca. Controle-PE-H: controle contendo apenas os reagentes utilizados em todo o processo.

² Determinada através de bioensaios com cotilédones de soja e as respectivas frações. Média de quatro experimentos (± erro padrão). Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes dos respectivos controles ao nível de 5% (P < 0,05) (teste-t).

³ Concentração de carboidratos determinada nas amostras, após os respectivos tratamentos, através do teste de antrona.

reu uma recuperação parcial da atividade elicitora (56,20%) na amostra hidrolisada (FEA-PE-Hidrolisada). Esta amostra FEA-PE-Hidrolisada mostrou possuir um conteúdo de carboidratos igual a 15,10 Eq μ g manose/ml, sendo que na fração elicitora FEA-P60-2 controle (FEA-PE-Controle) foi detectada uma concentração de carboidratos igual a 42,80 Eq μ g de manose/ml.

4.7.2.2. Tratamento com pronase

O tratamento com pronase da fração FEA-80, obtida pela precipitação etanólica fracionada da preparação bruta FEA a 80%, não afetou a atividade elicitora da amostra tratada (FEA-80-Pronase-T), conforme se verifica na Tabela 15. A fração FEA-80-Pronase-T, quando submetida à bioensaios com cotilédones de soja, apresentou uma atividade elicitora similar àquela detectada para a amostra controle, FEA-80-Pronase-C.

4.7.2.3. Tratamento com α -manosidase

Como pode ser observado na Tabela 16, o tratamento com α -manosidase da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA, não afetou a atividade elicitora e nem tampouco o conteúdo de carboidratos na amostra tratada (FEA- α -manosidase-Tratada). A fração FEA- α -manosidase-Tratada, quando submetida a bioensaios com cotilédones de soja, apresentou uma atividade elicitora simi

Tabela 15. Efeito do tratamento com pronase sobre a atividade elicitora da fração FEA-80, obtida pela precipitação etanólica fracionada da preparação FEA a 80%.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})
FEA-80-Pronase-C	1,107 ^b ± 0,053
FEA-80-Pronase-T	1,286 ^b ± 0,053
Controle-Pronase	0,346 ^a ± 0,031

¹ FEA-80-Pronase-C: fração FEA-80 igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão PBS 10 mM, pH 7,2, ao invés da enzima. FEA-80-Pronase-T: fração FEA-80 tratada com pronase; Controle - Pronase: controle contendo apenas os reagentes utilizados no tratamento.

² Determinada através de bioensaios com cotilédones de soja e as frações. Média de três experimentos (± erro padrão). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (P > 0,05) (teste-t).

Tabela 16. Efeito do tratamento com α -manosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	Carboidratos ³ (Eq μ g manose/ml)
FEA- α -manosidase- Controle	0,966 ^b $\pm$ 0,153	47,12
FEA- α -manosidase- Tratada	0,802 ^b $\pm$ 0,204	47,74
Controle- α -manosi- dase	0,163 ^a $\pm$ 0,018	0

¹ FEA- α -manosidase-Controle: fração FEA-P60-2 igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,6, ao invés da enzima. FEA- α -manosidase-Tratada: fração FEA-P60-2 tratada com α -manosidase. Controle- α -manosidase: controle contendo apenas os reagentes utilizados no tratamento.

² Determinada através de bioensaios com cotilédones de soja e as frações. Média de três experimentos ($\pm$ erro padrão). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% ($P > 0,05$) (teste-t).

³ Concentração de carboidratos determinada nas amostras após o tratamento, através do teste de antrona.

lar àquela detectada para a amostra controle, FEA- α -manosidase-Controle.

4.7.2.4. Tratamento com β -galactosidase

Conforme se verifica na Tabela 17, o tratamento com β -galactosidase da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA, não afetou a atividade elicitora e nem tampouco o conteúdo de carboidratos na amostra tratada (FEA- β -galactosidase-Tratada). A fração FEA- β -galactosidase-Tratada, quando submetida a bioensaios com cotilédones de soja, apresentou uma atividade elicitora similar àquela detectada para a amostra controle, FEA- β -galactosidase-Controle.

4.7.2.5. Tratamento com β -glucosidase

Através dos resultados apresentados na Tabela 18 pode-se verificar que o tratamento com β -glucosidase da fração FEA-P60-2, obtida na última etapa de purificação da preparação bruta FEA, não afetou a atividade elicitora, mas resultou em uma pequena redução (5,1%) no conteúdo total de carboidratos na amostra tratada (FEA- β -glucosidase-Tratada). A fração FEA- β -glucosidase-Tratada, quando submetida a bioensaios com cotilédones de soja, apresentou uma atividade elicitoras similar àquela detectada para a amostra controle, FEA- β -glucosidase-Controle.

Tabela 17. Efeito do tratamento com β -galactosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	Carboidratos ³ (Eq μ g manose/ml)
FEA- β -galactosidase- Controle	1,058 ^b $\pm$ 0,198	47,44
FEA- β -galactosidase- Tratada	1,121 ^b $\pm$ 0,181	48,66
Controle- β -galactosi- dase	0,229 ^a $\pm$ 0,023	0

¹ FEA- β -galactosidase-Controle: fração-P60-2 igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,0, ao invés da enzima. FEA- β -galactosidase-Tratada: fração FEA-P60-2 tratada com β -galactosidase. Controle- β -galactosidase: controle contendo apenas os reagentes utilizados no tratamento.

² Determinada através de bioensaios com cotilédones de soja e as frações. Média de três experimentos ($\pm$ erro padrão). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% ($P > 0,05$) (teste-t).

³ Concentração de carboidratos determinada nas amostras após o tratamento através do teste de antrona.

Tabela 18. Efeito do tratamento com β -glucosidase sobre a atividade elicitora da fração FEA-P60-2, obtida pela filtração da amostra FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60.

Frações ¹	Atividade elicitora ² (A _{285nm})	Carboidratos ³ (Eq μ g manose/ml)
FEA- β -glucosidase- Controle	1,112 ^b $\pm$ 0,019	48,04
FEA- β -glucosidase- Tratada	1,011 ^b $\pm$ 0,045	45,58
Controle- β -glucosi- dase	0,356 ^a $\pm$ 0,057	0

¹ FEA- β -glucosidase-Controle: fração FEA-P60-2 igual à tratada e submetida às mesmas condições, exceto que foi adicionado à mesma tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,2, ao invés da enzima. FEA- β -glucosidase-Tratada: fração FEA-P60-2, tratada com β -glucosidase. Controle- β -glucosidase: controle contendo apenas os reagentes utilizados no tratamento.

² Determinada através de bioensaios com cotilédones de soja e as frações. Média de três experimentos ($\pm$ erro padrão). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% ($P > 0,05$) (teste-t).

³ Concentração de carboidratos determinada nas amostras após o tratamento, através do teste de antrona.

5. DISCUSSÃO

5.1. PURIFICAÇÃO DO ELICITOR EXTRACELULAR DE *H. vastatrix* E CONSIDERAÇÕES SOBRE A SUA NATUREZA QUÍMICA

A utilização do bioensaio em cotilédones de soja desenvolvido por AYERS et alii (1976c), permitiu demonstrar a existência de substâncias extracelulares em uredíniosporos de *H. vastatrix*, capazes de desencadear a formação de fitoalexinas (Tabela 3). A atividade elicitora destas substâncias provenientes de *H. vastatrix* pode ser detectada empregando-se, nos bioensaios, a variedade de soja IAC-8, a qual foi previamente selecionada dentre as demais, por ser a mais adequada quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e pela uniformidade de resposta em presença da fração elicitora LEV-SD da preparação de *S. cerevisiae* (Figura 1 e Tabela 1). A variedade IAC-8 apresentou uma resposta em relação ao elicitor de *S. cerevisiae* similar àquela descrita por HAHN & ALBERSHEIM (1978) para o cultivar de soja "Harosoy 63", sendo as atividades elicitoras médias (A_{285nm}), descontadas dos valores obtidos para os controles, iguais a 0,682 e 0,657, respectivamente.

As substâncias extracelulares de *H. vastatrix*, apresentando atividade elicitora da síntese de gliceolina em tecidos de soja, puderam ser liberadas de urediniosporos autoclavados, por agitação destes em meio aquoso à temperatura ambiente (Tabela 3). A atividade elicitora do filtrado aquoso bruto de urediniosporos autoclavados (FEA), na concentração equivalente a 40 mg de urediniosporos por ml, foi igual a 0,997 (Tabela 3). Vários autores também detectaram em filtrados de cultura de alguns patógenos, componentes extracelulares dos mesmos, capazes de estimular a formação de fitoalexinas em tecidos de seus respectivos hospedeiros ou de plantas não-hospedeiras (AYERS et alii, 1976c; ANDERSON, 1978; DE WIT & ROSEBOOM, 1980; LEE & WEST, 1981 e TEPPER & ANDERSON, 1986).

A primeira etapa de purificação da preparação elicitora bruta FEA de *H. vastatrix*, através de precipitação etanólica fracionada, resultou na obtenção de apenas duas frações, FEA-60 e FEA-80, ativas como elicitores da síntese de gliceolina em tecidos de soja. Entretanto, a fração FEA-80, resultante da precipitação etanólica fracionada do FEA a 80% (v/v), se mostrou a mais ativa (AE = 1,197), sendo que a fração FEA-60 apresentou uma atividade elicitora (AE = 0,309) igual a 25,8% do valor detectado para a amostra FEA-80 (Tabela 5). A atividade elicitora relativa (AER) da fração FEA-80 foi igual a 32, sendo 5,3 vezes maior do que aquela apresentada pela preparação bruta FEA (AER = 6) (Tabela 12).

Estes resultados indicam que houve uma purificação parcial do elicitor extracelular, presente no filtrado aquoso bruto de uredíniosporos de *H. vastatrix*, através de precipitação etanólica fracionada. HAHN & ALBERSHEIM (1978) também verificaram que o elicitor da síntese de gliceolina, presente em extrato comercial de células autolisadas de *S. cerevisiae*, foi isolado utilizando-se como primeira etapa de purificação uma precipitação etanólica a 80% (v/v). Ainda, ANDERSON (1978) verificou que polissacarídeos presentes em filtrados de cultura de três espécies de *Colletotrichum*, ativos como elicitores da síntese de fitoalexinas em cotilédones de feijoeiro, puderam ser precipitados com etanol a 75% (v/v), sendo que as respectivas frações etanólicas sobrenadantes não apresentaram qualquer atividade elicitora.

O fracionamento da amostra elicitora FEA -80, através de cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina-A Sepharose 4B, resultou na obtenção de uma fração ativa, FEA-EI, a qual não apresentou afinidade por esta lectina (Figura 2 e Tabela 7). Esta fração apresentou uma atividade elicitora relativa igual a 54, sendo portanto 9 vezes mais ativa do que a preparação bruta FEA e 1,7 vezes mais ativa do que a amostra elicitora FEA-80 (Tabela 12). Estes resultados indicam que houve uma purificação do elicitor extracelular de *H. vastatrix* através do fracionamento da fração ativa FEA-80 em Concanavalina-A Sepharose-4B. AYERS et alii (1976a) e HAHN & ALBERSHEIM (1978) ao utilizarem esta técnica

ca cromatográfica para o isolamento dos elicitores da síntese de gliceolina provenientes, respectivamente, de paredes de micélio de três raças de *Pmg* e de extrato de células autolizadas de *S. cerevisiae*, verificaram também que estas substâncias não apresentaram afinidade pela Concanavalina-A. Entretanto, DE WIT & ROSEBOOM (1980) observaram que substâncias isoladas de filtrados de cultura de duas raças de *C. fulvum*, ativas como elicitores da síntese de rishitina em frutos de tomateiro, apresentaram afinidade pela referida lectina.

O fracionamento da amostra elicitora FEA-EI através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose resultou na obtenção de duas frações, FEA-A e FEA-B, ativas como elicitores da síntese de gliceolina em cotilédones de soja (Figura 3 e Tabela 9). Entretanto, a fração FEA-A, que não apresentou afinidade pelo trocador aniônico, se mostrou a mais ativa (Figura 3 e Tabela 9). A fração FEA-B, possuindo afinidade pela DEAE-celulose, apresentou uma atividade elicitora igual a 51,5% do valor detectado para a amostra FEA-A (Figura 3 e Tabela 9). A fração FEA-A apresentou uma atividade elicitora igual a 66, sendo, respectivamente, 11 e 1,2 vezes mais ativa, do que a preparação bruta FEA e a fração FEA-EI, indicando portanto, que houve uma purificação do elicitor extracelular de *H. vastatrix* através de cromatografia em DEAE-celulose (Tabela 12). Vários autores ao fracionarem, através de cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose ou em DEAE-Sefadex, substâncias ativas como elicitores da sín-

tese de fitoalexinas, provenientes de filtrados de cultura e paredes de micélio de diferentes fungos, verificaram, também, que as frações mais ativas não apresentaram afinidade pelo referido trocador aniônico (AYERS et alii, 1976a; AYERS et alii, 1976c; HAHN & ALBERSHEIM, 1978; DE WIT & ROSEBOOM, 1980 e TEPPER & ANDERSON, 1986).

A filtração da amostra elicitora FEA-A em coluna de Bio-Gel P-60 resultou na obtenção de uma fração, FEA-P60-2, ativa como elicitor da síntese de gliceolina em cotilédones de soja, sendo eluída no volume interno (Figura 5 e Tabela 11). Esta fração, obtida na última etapa de purificação do elicitor extracelular de *H. vastatrix*, possuindo portanto uma atividade elicitora relativa igual a 100, se mostrou respectivamente, 16,7 e 1,5 vezes mais ativa do que a preparação bruta FEA e a fração FEA-A (Tabela 12). O fato da atividade elicitora relativa ter sido gradativamente aumentada durante o processo de purificação do elicitor da síntese de gliceolina proveniente de uredíniosporos de *H. vastatrix*, indica que as técnicas utilizadas para o fracionamento desta substância biologicamente ativa mostraram-se efetivas. Vários autores trabalhando com componentes extracelulares de diferentes patógenos e de células de levedura, ativos como elicitores da síntese de fitoalexinas, observaram que a atividade biológica também aumentou durante as várias etapas de purificação destas substâncias (AYERS et alii, 1976c; ANDERSON, 1978; HAHN & ALBERSHEIM, 1978; DE WIT & ROSEBOOM, 1980 e TEPPER & ANDERSON, 1986).

O elicitor extracelular de *H. vastatrix* mostrou-se ativo mesmo quando concentrações equivalentes a 0,92 µg de carboidrato foram aplicadas por cotilédone, sendo que a atividade elicitora aumentou quando foram utilizadas concentrações crescentes da fração elicitora FEA-P60-2 (Figura 6). Pôde-se verificar, ainda, que a resposta dos tecidos de soja em relação ao elicitor de *H. vastatrix* atingiu um valor máximo, quando foi aplicada uma concentração desta substância equivalente a aproximadamente 10 µg de carboidrato por cotilédone (Figura 6). A curva de atividade elicitora em função da concentração do elicitor extracelular de *H. vastatrix* apresentou um aspecto similar àquelas obtidas para os elicitores da síntese de gliceolina provenientes de *Pmg* e de *S. cerevisiae* (AYERS et alii, 1976c e HAHN & ALBERSHEIM, 1978). ZIEGLER & PONTZEN (1982), utilizando nos bioensaios os cultivares de soja "Harosoy" e "Harosoy 63" e o elicitor da síntese de gliceolina proveniente de parede de micélio de *Pmg*, na concentração de 1 Eq µg de glucose por ml (0,075 Eq µg de glucose/cotilédone), detectaram atividades elicitoras iguais a $0,954 \pm 0,167$ e $1,188 \pm 0,271$, respectivamente. No presente trabalho, foi detectada uma atividade elicitora igual a $1,012 \pm 0,078$, quando foi empregada uma concentração do elicitor de *H. vastatrix* igual a 49,30 Eq µg de manose por ml (3,70 Eq µg de manose/cotilédone), que corresponde a 27,39 Eq µg de glucose por ml (2,06 Eq µg de glucose/cotilédone) (Tabela 11). Aparentemente, o elicitor extracelular de *H. vas-*

tatrix parece ser menos ativo do que aquele extraído de paredes de micélio de *Pmg*, embora uma comparação precisa não possa ser feita uma vez que as variedades de soja utilizadas foram diferentes. Por outro lado, KEEN et alii (1983) em bioensaios com cotilédones de soja empregando-se o cultivar "Haro soy 63", verificaram terem sido necessárias concentrações de quitina e quitosana iguais a 4.000 µg por ml, para detecção de uma atividade elicitora correspondendo a metade da atividade máxima. Assim, o elicitor proveniente de uredíniosporos de *H. vastatrix* parece ser muito mais ativo do que as referidas substâncias, polímeros de glucosamina, as quais estão presentes nas paredes celulares de alguns fungos. Ainda, glicoproteínas extraídas de *C. fulvum*, foram ativas como elicitores da síntese de rishitina em folhas e frutos de tomateiro, a concentrações iguais a 250 µg por ml (DE WIT & ROSEBOOM, 1980). TEPER & ANDERSON (1986) verificaram que uma fração obtida pela purificação de filtrados de cultura da raça α -de *C. lindemuthianum*, mostrou-se muito ativa como elicitora da síntese de fitoalexinas em tecidos do cultivar de feijão "Dark Red Kidney" na concentração de 5 Eq µg de glucose por cotilédone. Resultados similares foram observados no presente trabalho para o elicitor da síntese de gliceolina proveniente de *H. vastatrix* em relação à variedade de soja IAC-8 (Tabela 11).

Os estudos efetuados visando elucidar a natureza química do elicitor da síntese de gliceolina proveniente de *H. vastatrix* sugerem que esta substância biologicamen

te ativa seja um polissacarídeo. O elicitor, solúvel em meio aquoso, se mostrou termoestável, pois além de ter sido liberado de uredíniosporos autoclavados de *H. vastatrix*, não perdeu sua atividade biológica quando submetido à fervura por 5 ou 10 min nos diferentes tratamentos efetuados, com as glicosidases e a pronase, respectivamente (Tabelas 15, 16, 17 e 18). Os testes químicos efetuados com a preparação elicitora bruta FEA de *H. vastatrix* e com as frações subsequentes resultantes de sua purificação revelaram a presença nestas frações, de carboidratos e proteínas (Tabelas 2, 4, 6, 8 e 10). Ainda, a fração elicitora mais pura, FEA-P60-2, mostrou ser rica em carboidratos, apresentando proporções de carboidratos e proteínas iguais a 86,48 e 13,52%, respectivamente (Tabela 10). Porém, os resultados obtidos pelo tratamento do elicitor de *H. vastatrix* com pronase, onde se verificou que o mesmo não teve qualquer efeito sobre a atividade elicitora da amostra tratada, sugerem que a natureza química do elitor não seja protéica (Tabela 15). Esta idéia é enfatizada pela estabilidade do elicitor ao calor. Foi observado também, que o elicitor extracelular de *H. vastatrix*, presente na preparação bruta FEA, pode ser precipitado com etanol a 80% (v/v) (Tabela 5), similarmente aos polissacarídeos isolados de células autolisadas de *S. cerevisiae* e de filtrados de cultura de três espécies de *Colletotrichum*, ativos como elicitores da síntese de fitoalexinas em tecidos de soja e feijoeiro, respectivamente (HAHN & ALBERSHEIM, 1978 e AN-

DERSON, 1978). Ainda, o elicitor de *H. vastatrix* estudado no presente trabalho, não mostrou possuir afinidade pelo trocador aniônico dietilaminoetil-celulose (Figura 3 e Tabela 9), característica esta apresentada por elicitores da síntese de fitoalexinas isolados de diferentes fungos os quais foram caracterizados como sendo polissacarídeos (AYERS et alii, 1976a; AYERS et alii, 1976c; HAHN & ALBERSHEIM, 1978 e TEPER e ANDERSON, 1986). Outra evidência concernente à natureza polissacarídica do elicitor extracelular de *H. vastatrix*, foi obtida no presente trabalho, quando a fração FEA-P60 - 2, foi submetida ao tratamento com metaperiodato de sódio (Tabela 14). O metaperiodato de sódio é capaz de oxidar átomos de carbono vizinhos apresentando grupos hidroxila (hidroxilas vicinais) produzindo os dialdeídos correspondentes. Assim, o tratamento de glicoproteínas, glicopeptídeos ou polissacarídeos com metaperiodato de sódio pode provocar a clivagem da cadeia de carbono dos monossacarídeos presentes nestas substâncias. Pelos resultados aqui obtidos pode-se verificar que o tratamento do elicitor extracelular de *H. vastatrix* com metaperiodato de sódio levou a uma perda quase completa da atividade elicitora (94,63%), bem como a uma diminuição de 45,33% no conteúdo de carboidratos na amostra tratada (Tabela 14). Estes resultados indicam que houve uma clivagem da cadeia de carbono dos monossacarídeos componentes dos polissacarídeos presentes na fração FEA-P60-2, levando a uma perda na atividade elicitora da síntese de gliceolina. A dimi-

nuição de 45,33% no conteúdo de carboidratos na amostra tratada sugere, ainda, a presença, nas moléculas de polissacarídeos, de ligações não suscetíveis à oxidação por metaperiodato, sendo que as mesmas parecem não ser essenciais para a atividade elicitora, uma vez que foi observado na amostra tratada uma perda quase total da atividade biológica (Tabela 14). A suscetibilidade de elicitores da síntese de fitoalexinas à oxidação com metaperiodato de sódio e consequentemente a diminuição, observada após os tratamentos, nas respectivas atividades elicitoras foram utilizadas por vários autores como indicações de que as substâncias por eles estudadas possuíam natureza polissacarídica, associadas ainda ao fato das mesmas serem estáveis ao tratamento com pronase (AYERS et alii, 1976c; ANDERSON, 1978 e KEEN & LEGRAND, 1980). Foi observado ainda que quando o elicitor de *H. vastatrix* tratado com metaperiodato foi submetido a uma redução com borohidreto de sódio e a uma posterior hidrólise ácida fraca, ocorreu uma recuperação parcial da atividade elicitora (56,20%) na amostra hidrolisada (Tabela 14). Estes resultados poderiam sugerir que a hidrólise ácida fraca teria levado à exposição de novos resíduos glicosil terminais na cadeia polissacarídica do elicitor previamente tratado com periodato, fornecendo assim uma estrutura similar àquela apresentada pelo elicitor ativo. Resultados similares foram obtidos por ALBERSHEIM & VALENT (1978) para o elicitor da síntese de gliccolina proveniente de *Pmg*.

A fração elicitora mais pura, FEA-P60-2, obtida na última etapa da purificação do elicitor extracelular de *H. vastatrix*, mostrou possuir como principal açúcar componente, a manose (88,77%), seguida pela glucose (6,67%) e galactose (4,56%), não tendo sido detectados nesta amostra, a presença de ácidos urônicos, nem tampouco de glucosamina e galactosamina (Figura 7 e Tabela 13). Os açúcares manose, galactose e glucose foram detectados em todas as frações elicitoras provenientes de *H. vastatrix*, embora presentes, nas mesmas, em diferentes proporções (Figura 7 e Tabela 13). A precipitação etanólica fracionada, a diálise, bem como as diferentes técnicas cromatográficas utilizadas para a purificação do elicitor extracelular proveniente de uredíniosporos de *H. vastatrix*, não puderam separar os referidos açúcares. Este fato sugere que a manose, glucose e galactose seriam os monossacarídeos componentes das mesmas moléculas dos polissacarídeos presentes na fração elicitora FEA-P60-2. Por outro lado, o elicitor de *H. vastatrix* não apresentou afinidade pela lectina Concanavalina-A, a qual apresenta sítios de ligação específicos para resíduos α -D-manosil, α -D-glucosil e resíduos estericamente similares (Figura 2 e Tabela 7). Ainda, o tratamento da fração FEA-P60-2 com a enzima α -manosidase, não afetou a atividade elicitora e tampouco o conteúdo de carboidratos na amostra tratada (Tabela 16), apesar da manose ser o principal açúcar componente nesta fração (Figura 7 e Tabela 13). Estes resultados sugerem que os monossa-

carídeos componentes das moléculas de polissacarídeos extracelulares presentes na fração FEA-P60-2 e ativos como elicitores da síntese de gliceolina, estão unidos entre si por ligações do tipo β . Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por LEAL et alii (1983), que, utilizando cromatografia a gas e análise por infravermelho, identificaram polissacarídeos, isolados de urediniosporos de *H. vastatrix* por hidrólise alcalina em solução de hidróxido de sódio 1M a 22°C, como sendo β -glucomananas. Estes autores verificaram ainda, que as proporções molares de glucose e manose nestes polissacarídeos, foram iguais a 13 e 86%, respectivamente. Entretanto, os referidos autores, extraíram estes polissacarídeos por hidrólise alcalina, objetivando um estudo da composição dos urediniosporos de *H. vastatrix*, não correlacionando estas substâncias com quaisquer atividades biológicas. O fracionamento da fração elicitora FEA-80 através de cromatografia de afinidade em Concanavalina-A Sepharose 4B indicou, ainda, que 9,12% dos polissacarídeos eluídos da coluna e retidos pela membrana de diálise, apresentaram afinidade pela referida lectina, sendo constituídos por manose (Figuras 2 e 7; Tabela 6). Entretanto, estas α -mananas, não se mostraram ativas como elicitores da síntese de gliceolina (Tabela 7). Os tratamentos do elicitor de *H. vastatrix* com as enzimas β -glucosidase e β -galactosidase, onde se verificou que os mesmos não apresentaram qualquer efeito sobre a atividade elicitora das amostras tratadas, sugerem que a ati

vidade biológica pode não se dever à presença dos resíduos de glucose e de galactose nas moléculas dos polissacarídeos mas, provavelmente, às β -mananas, uma vez que as mesmas aparecem como componente principal na fração elicitora (Tabelas 13, 17 e 18). O pequeno decréscimo (5,1%) observado no conteúdo total de carboidratos após o tratamento do elicitor de *H. vastatrix* com β -glucosidase, pode indicar que esta enzima se mostrou ativa, uma vez que a quantidade normal de glucose na amostra FEA-P60-2 é baixa, não excedendo a 6,67% dos açúcares totais (Tabelas 13 e 18). Entretanto, no caso do tratamento com a enzima β -galactosidase, não poderia ser descartada a possibilidade dos resíduos de galactose presentes no polissacarídeo de *H. vastatrix*, serem estericamente inacessíveis ao ataque pela referida glicosidase. Ainda, poderiam ser obtidas evidências diretas da participação real das β -mananas na atividade do elicitor extracelular de *H. vastatrix*, se o tratamento desta substância com a enzima β -manosidase acarretasse a perda de sua atividade biológica. Entretanto, este experimento não pode ser realizado, uma vez que a referida enzima não é disponível no comércio. Contrariamente ao elicitor extracelular de *H. vastatrix*, estudado no presente trabalho, os elicitores da síntese de gliceolina extraídos de células autolisadas de *S. cerevisiae* e de paredes de micélio de *Pmg*, foram identificados como sendo β -glucanas (HAHN & ALBERSHEIM, 1978; AYERS et alii, 1976c e ALBERSHEIM & VALENT, 1978). SHARP et alii (1984b) isolaram e purificaram

da parede do micélio de *Pmg*, o menor oligossacarídeo que possuía ainda atividade elicitora da síntese de gliceolina em tecidos de soja. Apesar de terem sido obtidos oito isômeros hexa(β -D-glucopiranosil)-D-glucitois, apenas um mostrou ser biologicamente ativo, sendo que os autores concluíram que os resíduos glucosil terminais, apresentando uma orientação espacial específica, eram requeridos para a atividade elicitora da síntese de gliceolina (SHARP et alii, 1984a). Ainda, foram identificados sítios de ligação em membranas de células de soja para elicitores da síntese de gliceolina, a micolaminarina e β -glucanas, isoladas, respectivamente, de *Phytophthora* spp. e de *Pmg* (YOSHIKAWA et alii, 1983; COSIO et alii, 1988). O fato de polissacarídeos extracelulares provenientes de *H. vastatrix*, constituídos principalmente de β -mananas e apresentando em sua composição apenas uma pequena proporção de resíduos de glucose (6,67%) (Figura 7 e Tabela 13) serem ativos como elicitores da síntese de gliceolina em tecidos de soja, sugere que outros aspectos concernentes a esta atividade biológica, devam ser considerados. O primeiro aspecto importante reside no fato de que a atividade de substâncias como elicitores da síntese de gliceolina, não requer necessariamente que estes elicitores sejam constituídos principalmente por resíduos de glucose (β -glucanas). Por outro lado, resíduos de açúcar unidos entre si por ligações do tipo β , poderiam fornecer uma estrutura espacial similar àquela requerida para que ocorra a ligação do elicitor

ao sítio receptor presente em células de soja. A existência de ligações do tipo β entre os monossacarídeos componentes de polissacarídeos ativos como elicitores da síntese de gliceolina, poderia ser importante para esta atividade biológica. Esta idéia é enfatizada pelo fato de que frações provenientes de *H. vastatrix*, de *S. cerevisiae* e de *Pmg*, as quais não apresentaram afinidade pela Concanavalina-A sendo constituídas principalmente por α -mananas, não se mostraram ativas como elicitores da síntese de gliceolina (Figuras 2 e 7; Tabela 7) (HAHN & ALBERSHEIM, 1978; ZIEGLER & PONTZEN, 1982).

O elicitor extracelular de *H. vastatrix* mostrou possuir um peso molecular menor que 60.000 e maior que 6.000-8.000 daltons, pois foi, respectivamente, eluído no volume interno da coluna de Bio-Gel P-60 e retido no interior da membrana de diálise. A filtração da fração elicitora FEA-A através de coluna de Bio-Gel P-60 permitiu separar, do elicitor de *H. vastatrix*, uma fração (FEA-P60-1) contendo um polissacarídeo de peso molecular maior, inativo como elicitor da síntese de gliceolina e constituído principalmente de β -galactanas (Figuras 5 e 7; Tabelas 10 e 11). Foi detectada ainda, na fração elicitora FEA-P60-2 a presença de proteínas (7,71 Eq μ g SAB/ml) (Tabela 10). Estas proteínas mostraram um padrão de curva de eluição da coluna de Bio-Gel P-60, similar àquele observado para os carboidratos, embora tenham sido detectadas, nas frações eluídas, em concentrações

comparativamente bem menores (Figura 5). Esta observação, associada ao fato de que estas proteínas ou peptídeos, não puderam ser separadas dos carboidratos pelas técnicas de purificação utilizadas, poderiam sugerir que as mesmas estariam ligadas aos polissacarídeos, ativos como elicitores da síntese de gliceolina. Entretanto, estas proteínas presentes na fração mais pura, FEA-P60-2, estando ou não ligadas aos polissacarídeos extracelulares de *H. vastatrix*, não se mostraram essenciais para a atividade elicitora (Tabela 15).

5.2. INESPECIFICIDADE DO ELICITOR EXTRACELULAR DE *H. vastatrix*

O polissacarídeo extracelular isolado de ureidinosporos autoclavados de *H. vastatrix* mostrou possuir uma atividade biológica inespecífica, pois foi capaz de desencadear a síntese de fitoalexinas em uma planta não-hospedeira a *H. vastatrix*, como a soja (Tabela 11). Vários autores demonstraram a inespecificidade de substâncias, isoladas de diferentes fungos fitopatogênicos, como elicitores da síntese de fitoalexinas, sendo ativas em plantas hospedeiras e não-hospedeiras (CRUICKSHANK & PERRIN, 1968; CLINE et alii, 1978; ANDERSON, 1978; DE WIT & ROSEBOOM, 1980; TIETJEN et alii, 1983 e KOMBRINK & HAHNBROCK, 1986). Os resultados obtidos no presente trabalho, concernentes à inespecificidade dos po-

lissacarídeos extracelulares de urediniosporos de *H. vastatrix*, como elicitores bióticos, inespecíficos, corroboram a hipótese formulada por ALBERSHEIM & VALENT (1978) e DARVILL & ALBERSHEIM (1984), de que a síntese de fitoalexinas se constitui em um mecanismo efetivo e geral utilizado pelas plantas para se defenderem do ataque de microorganismos não-patogênicos ou de raças avirulentas de um patógeno. GUZZO & MORAES (1985) verificaram, ainda, que o filtrado aquoso de urediniosporos não-autoclavados de *H. vastatrix*, contém substâncias ativas como elicitores da síntese de gliceolina em cotilédones de soja. Poderia se supor, com base nos resultados aqui obtidos, bem como naqueles encontrados por GUZZO & MORAES (1985), que, na natureza, os urediniosporos de *H. vastatrix* em contato com um meio aquoso e estando sobre a superfície de uma planta não-hospedeira, como a soja, poderiam liberar estas substâncias elicitoras, as quais se constituiriam em um sinal para as plantas iniciarem o processo de síntese de fitoalexinas.

GUZZO et alii (1987) verificaram que substâncias de natureza polissacarídica presentes em filtrato aquoso de urediniosporos autoclavados de *H. vastatrix*, induzem proteção em cafeeiros suscetíveis (cv. Mundo Novo) a uma subsequente inoculação com o patógeno. Estes polissacarídeos, compostos principalmente por manose (81,63%) puderam ser precipitados com etanol a 80% (v/v), não apresentaram afinidade pela lectina Concanavalina-A, e tampouco pela forte resi-

na catiônica AG-50W e, finalmente, sua atividade biológica não foi alterada pelos tratamentos com α -manosidase e β -glucosidase. Os resultados obtidos no presente trabalho, bem como aqueles encontrados por GUZZO et alii (1987), sugerem que estas substâncias provenientes de uredíniosporos de *H. vastatrix*, biologicamente ativas, poderiam ser responsáveis pela ativação de diferentes mecanismos de resistência de plantas a fitopatógenos. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por HUMME et alii (1981), que verificaram que substâncias de natureza polissacarídica extraídas, por autoclavagem, das paredes celulares de tubos germinativos de uredíniosporos de *U. phaseoli*, foram capazes de induzir resistência e a síntese de fitoalexinas, após infiltração em folhas primárias de um cultivar de feijoeiro suscetível a este fitopatógeno. Ainda, KOMBRINK & HAHLBROCK (1986) verificaram que fragmentos de parede celular de diferentes fungos fitopatogênicos, extraídos pela ação do calor, foram ativos como elicitores da síntese de fitoalexinas em cultura de células de salsa em suspensão. Estas substâncias elicitoras foram também capazes de ativar a síntese das enzimas hidrolíticas, quitinase e 1,3- β -glucanase, envolvidas nos mecanismos de resistência de plantas a fitopatógenos. BONHOFF & GRISEBACH (1988), verificaram também, que substâncias, capazes de elicitar o acúmulo de gliceolina em raízes de soja, induziram ainda, a formação de calose e proteção localizada contra uma posterior inoculação com o patógeno *Pmg*.

Embora estudos posteriores devam ser desenvolvidos visando o esclarecimento dos mecanismos de ação de elicitores bióticos inespecíficos, da síntese de fitoalexinas, os resultados obtidos no presente trabalho, bem como a vasta pesquisa desenvolvida por vários autores até o presente momento, sugerem que estas substâncias são capazes de ativar diferentes mecanismos de defesa que conferem às plantas resistência à doenças.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. A variedade de soja IAC-8 mostrou ser a mais adequada quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e quanto à uniformidade de resposta em presença do elicitor proveniente de *S. cerevisiae*.
2. Substâncias presentes no filtrato aquoso bruto de uredíniosporos autoclavados de *Hemileia vastatrix* são capazes de desencadear a síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, variedade IAC-8.
3. O elicitor extracelular proveniente de uredíniosporos de *H. vastatrix* é precipitado com etanol a 80% (v/v), não apresenta afinidade pela lectina Concanavalina - A Sepharose 4B e tampouco pelo trocador aniônico dietilaminoetil-celulose.
4. O elicitor extracelular de *H. vastatrix* mostrou possuir um peso molecular menor que 60.000 e maior que

6.000 daltons, sendo eluído no volume interno de uma coluna de Bio-Gel P-60 e retido no interior da membrana de diálise.

5. A atividade elicitora relativa aumentou gradativamente durante o processo de purificação do elicitor extracelular proveniente de *H. vastatrix*, sendo que a fração elicitora mais pura apresentou uma atividade elicitora relativa 16,7 vezes maior que o filtrado aquoso bruto de *H. vastatrix*.
6. O elicitor extracelular purificado proveniente de urediniosporos de *H. vastatrix* mostrou-se ativo mesmo quando concentrações equivalentes a 0,92 µg de carboidratos foram aplicadas por cotilédone. A atividade elicitora aumentou quando foram utilizadas concentrações crescentes do elicitor purificado, atingindo um máximo à concentrações equivalentes a 10 µg de carboidrato por cotilédone.
7. O elicitor extracelular de *H. vastatrix* é solúvel em água, é termoestável, resiste ao tratamento com pronase e é suscetível à oxidação com metaperiodato de sódio.
8. O elicitor extracelular de *H. vastatrix* não perde sua atividade elicitora da síntese de gliceolina em cotilédones de soja, quando submetido a tratamentos enzi-

máticos com α -manosidase, β -galactosidase e β -glucosidase.

9. O tratamento do elicitor de *H. vastatrix* com β -glucosidase leva a um decréscimo no conteúdo de carboidratos na amostra tratada (5,1%), contrariamente aos tratamentos com α -manosidase e β -galactosidase.
10. O elicitor extracelular de *H. vastatrix* perde sua atividade elicitora quando submetido a tratamento com metaperiodato (94,63%), sendo que sua atividade biológica é parcialmente recuperada (56,20%) após redução com borohidreto de sódio e posterior hidrólise ácida fraca.
11. A fração elicitora mais pura, proveniente de urediniosporos de *H. vastatrix* é rica em carboidratos, apresentando proporções de carboidratos e proteínas iguais a 86,48 e 13,52%, respectivamente.
12. O elicitor extracelular purificado proveniente de urediniosporos de *H. vastatrix*, possui natureza polissacarídica, apresentando como principal componente a manose (88,77%), seguida pela glucose (6,67%) e galactose (4,56%), estando estes monossacarídeos unidos entre si por ligações do tipo β .

13. Não foi detectada na fração elicitora mais pura, proveniente de urediniosporos de *H. vastatrix*, a presença de ácidos urônicos, e tampouco de galactosamina e glucosamina.
14. O polissacarídeo extracelular isolado de urediniosporos autoclavados de *H. vastatrix* possui uma atividade elicitora inespecífica, sendo capaz de desencadear a formação de fitoalexinas em uma planta não hospedeira de *H. vastatrix*, como a soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P. & VALENT, B. Host-pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. J. Cell Biol., New York, 78: 627-643, 1978.
- ANDERSON, A.J. Isolation from three species of *Colletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean Phytopathol., St.Paul, 68: 189-194, fev. 1978.
- ANDERSON, A.J. Differences in the biochemical compositions and elicitor activity of extracellular components produced by three races of a fungal plant pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. Can. J. Microbiol., Ottawa, 26: 1473-1479, 1980.
- AYERS, A.R.; GOODELL, J.J.; DE ANGELIS, P.L. Plant detection of pathogens. In: COOPER-DRIVER, G.A.; SWAIN, T.; CONN, E.C., ed. Chemically mediated interactions between plants and other organisms, Recent advances in phytochemistry. New York, Appleton-Century-Crofts, 1985. vol.19. p.1-20.
- AYERS, A.R.; EBEL, J.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol., Lancaster, 57: 760-765, 1976a.

- AYERS, A.R.; VALENT, B.; EBEL, J.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. Plant Physiol., Lancaster, 57: 766-774, 1976b.
- AYERS, A.R.; EBEL, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol., Lancaster, 57: 751-759, 1976c.
- BAILEY, J.A. Mechanisms of phytoalexin accumulation. In: BAILEY, J.A. and MANSFIELD, J.W., ed. Phytoalexins. Glasgow, Blackie & Son Ltd., 1982. p.289-318.
- BELL, A.A. & PRESLEY, J.T. Heat-inhibited or heat - killed conidia of *Verticillium albo-atrum* induce disease resistance and phytoalexin synthesis in cotton. Phytopathol., St. Paul, 59: 1147-1151, ago. 1969.
- BIO-RAD LABORATORIES. Chromatography, electrophoresis and membrane filtration. Richmond, California-USA, 1976.144p.
- BONHOFF, A. & GRISEBACH, H. Elicitor-induced accumulation of glyceollin and callose in soybean roots and localized resistance against *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Plant Science, Limerick, 54(3): 203-209, 1988.
- BONHOFF, A.; LOYAL, R.; EBEL, J.; GRISEBACH, H. Race: cultivar-specific induction of enzymes related to phytoalexin biosynthesis in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Arch. Biochem. Biophysics, New York, 246(1): 149-154, abr. 1986.

- BOSTOCK, R.M.; LAINE, R.A.; KUČ, J.A. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. Plant Physiol., Lancaster, 70: 1417-1424, 1982.
- BURDEN, R.S. & BAILEY, J.A. Structure of the phytoalexin from soybean. Phytochem., Oxford, 14: 1389-1390, 1975.
- BUSHNELL, W.R. & ROWELL, J.B. Suppressors of defense reactions: a model for roles in specificity. Phytopathol., St. Paul, 71(10): 1012-1014, 1981.
- CALLOW, J.A.; ESTRADA-GARCIA, M.T.; GREEN, J.R. Recognition of non-self: the causation and avoidance of disease. Ann. of Botany, London, 60(4): 3-14, 1987.
- CARTWRIGHT, D.W.; LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J.; LEWORTHY, D.P.; RIDE, J.P. Isolation and characterization of two phytoalexins from rice as momilactones A and B. Phytochem., Oxford, 20: 535-537, 1981.
- CHAMBERLAIN, D.W. & PAXTON, J.D. Protection of soybean plants by phytoalexin. Phytopathol., St. Paul, 58(10): 1349 - 1350, out. 1968.
- CLINE, K.; WADE, M.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XV. Fungal glucans which elicit phytoalexin accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexins in other plants. Plant Physiol., Lancaster, 62: 918-921, 1978.
- CONDON, P. & KUČ, J. Confirmation of the identity of a fungitoxic compound produced by carrot root tissue. Phytopathol., St. Paul, 52(2): 182-183, fev. 1962.

- COSIO, E.G.; POPPERL, H.; SCHMIDT, W.E.; EBEL, J. High-affinity binding of a fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fractions and protoplasts. Eur. J. Biochem., Berlin, 175(2): 309-316, 1988.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. Nature, London, 187: 799-800, ago. 1960.
- CRICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. Phytoalexins of the leguminosae. Phaseolin from *Phaseolus vulgaris* L. Life Sciences, New York, 2(9): 680-682, set. 1963a.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. Studies on phytoalexins. VI. Pisatin: the effect of some factors on its formation in *Pisum sativum* L., and the significance of pisatin in disease resistance. Aust. J. Biol. Sci., Melbourne, 16(1): 111-128, 1963b.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D.R. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. Life Sciences, Oxford, 7(10): 449-458, 1968.
- DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Phytoalexin and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., Palo Alto, 35: 243-275, 1984.
- DAVIS, K.R.; LYON, G.D.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. Plant Physiol., Lancaster, 74: 52-60, 1984.

- DE WIT, P.J.G.M. & ROSEBOOM, P.H.M. Isolation, partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell walls of *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*). Physiol. Plant Pathol., London, 16: 391-408, 1980.
- DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R.L. and WOLFROM, M.L., ed. Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, 1962. vol. 1, p.478-512.
- DOKE, N. & TOMIYAMA, K. Suppression of the hypersensitive response of potato tuber protoplasts to hyphal wall components by water soluble glucans isolated from *Phytophthora infestans*. Physiol. Plant Pathol., London, 16: 177-186, 1980.
- DOW, J.M. & CALLOW, J.A. Partial characterization of glycopeptides from culture filtrates of *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri (syn. *Cladosporium fulvum*), the tomato leaf mould pathogen. J. Gen. Microbiol., Colchester, 113: 57-66, 1979.
- EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 24: 235-264, 1986.
- EBEL, J. & GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: a molecular analysis. Trends Biochem. Sciences, Cambridge, 13(1): 23-27, jan. 1988.
- EBEL, J.; AYERS, A.R.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XII. Response of suspension - cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. Plant Physiol., Lancaster, 57: 775-779, 1976.

- EPPERLEIN, M.M.; NORONHA-DUTRA, A.A.; STRANGE, R.N. Involvement of the hydroxyl radical in the abiotic elicitation of phytoalexins in legumes. Physiol. Mol. Plant Pathol., London, 28: 67-77, 1986.
- GUZZO, S.D. & MORAES, W.B.C. Carbohydrates from *Hemileia vastatrix* and the elicitation of glyceollin in soybean. In: Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Reno-USA, 1985. Phytopathol., St. Paul, 75 (11): 1372, nov. 1985 (Resumo).
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. Fitopatol. Bras., Brasília, 12(4): 377-385, dez. 1987.
- HADWIGER, L.A. & BECKMAN, J.M. Chitosan as a component of pea - *Fusarium solani* interactions. Plant Physiol., Lancaster, 66(2): 205-211, ago. 1980.
- HAHN, M.G. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. Plant Physiol., Lancaster, 62(1): 107-111, jul. 1978.
- HAHN, M.G.; BONHOFF, A.; GRISEBACH, H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Plant Physiol., Lancaster, 77: 591-601, 1985.

- HAHN, M.G.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol., Lancaster, 68: 1161-1169, 1981.
- HARGREAVES, J.A. Investigations into the mechanism of mercuric chloride stimulated phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. Physiol. Plant Pathol., London, 15: 279-287, 1979.
- HARGREAVES, J.A. & BAILEY, J.A. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. Physiol. Plant Pathol., London, 13: 89-100, 1978.
- HEITEFUSS, R. General review of active defense mechanisms in plants against pathogens. In: WOOD, R.K.S., ed. Active defense mechanisms in plants. New York, Plenum Press, 1982. p.1-18.
- HERMANN, R. & ZIEGLER, E. Localization of α -mannan in the hyphal wall of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and its possible relevance to the host-pathogen interaction of the fungus with soybeans (*Glycine max*). Phytopath. Z., Berlin, 109: 363-366, 1984.
- HÜMME, B.; HOPPE, H.H.; HEITEFUSS, R. Glucane aus Zellwänden der Uredosporenkeimschläuche von *Uromyces phaseoli* als Elicitoren der Phytoalexinanreicherung in *Phaseolus vulgaris*. Phytopath. Z., Berlin, 101: 51-64, 1981.
- JONES, T.M. & ALBERSHEIM, P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. Plant Physiol., Lancaster, 49: 926-936, 1972.

- KATSUI, N.; MURAI, A.; TAKASUGI, M.; IMATZUMI, K.; MASAMUNE, T. The structure of rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. J. Chem. Soc. Chem. Comm., London, 43-44, 1968.
- KEEN, N.T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? Science, Washington, 187: 74-75, jan. 1975.
- KEEN, N.T. Specific recognition in gene-for-gene host-parasite systems. In: INGRAM, D.S. and WILLIAMS, P.H., ed. Advances in plant pathology. London, Academic Press, 1982. vol. 1, p.35-82.
- KEEN, N.T. Phytoalexins and their involvement in plant disease resistance. Iowa State J. Research, Ames, 60 (4): 477-499, maio 1986.
- KEEN, N.T. & LEGRAND, M. Surface glycoproteins: evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Phy-siol. Plant Pathol., London, 17: 175-192, 1980.
- KEEN, N.T. & YOSHIKAWA, M. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. Plant Physiol., Lancaster, 71: 460-465, 1983.
- KEEN, N.T.; PARTRIDGE, J.E.; ZAKI, A.I. Pathogen -produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. In: 64th Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Mexico City, 1972. Phytopathol., St.Paul, 62: 768, 1972 (Resumo).

- KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M.; WANG, M.C. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* and other sources. Plant Physiol., Lancaster, 71: 466-471, 1983.
- KLARMAN, W.L. & GERDEMANN, J.W. Induced susceptibility in soybean plants genetically resistant to *Phytophthora sojae*. Phytopathol., St. Paul, 53(7): 863-864, jul. 1963.
- KOMBRINK, E. & HAHLBROCK, K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor - induced reactions. Plant Physiol., Lancaster, 81(1): 216-221, 1986.
- KUBOTA, T. & MATSUURA, T. Chemical studies on the black rot disease of sweet potato. J. Chem. Soc. Jpn. (Pure Chem. Sect.), Tokyo, 74: 248-251, 1953.
- KUČ, J. & CARUSO, F.L. Activated coordinated chemical defense against disease in plants. In: HEDIN, P.A., ed. Host plant resistance to pests, ACS Symposium Series 62. Washington, D.C., Amer. Chem. Soc. Press, 1977. p.78-89.
- KURANTZ, M.J. & OSMAN, S.F. Class distribution, fatty acid composition and elicitor activity of *Phytophthora infestans* mycelial lipids. Physiol. Plant Pathol., London, 22: 363-370, 1983.
- LAZAROVITS, G. & HIGGINS, V.J. Biological activity and specificity of a toxin produced by *Cladosporium fulvum*. Phytopathol., St. Paul, 69(10): 1056-1061, 1979.
- LEAL, J.A.; GOMEZ-MIRANDA, B.; RUPEREZ, P. Polysaccharides from *Hemileia vastatrix* uredospores. Exper. Mycology, London, 7: 82-89, 1983.

- LEE, S.C. & WEST, C.A. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of casebene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. Plant Physiol., Lancaster, 67: 633-639, 1981.
- LETCHER, R.M.; WIDDOWSON, D.A.; DEVERALL, B.J.; MANSFIELD, J.W. Identification and activity of wycorone acid as a phytoalexin in broad bean (*Vicia faba*) after infection by *Botrytis*. Phytochem., Oxford, 9: 249-252, 1970.
- LI, Y.-T & LI, S.-C. α -mannosidase, β -N-acetylhexosaminidase and β -galactosidase from jack bean meal. In: GINSBURG, V., ed. Complex carbohydrates part B, Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1972. Vol. 28, p.702-713.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193: 265-275, 1951.
- LYNE, R.L. & MULHEIRN, L.J. Minor pterocarpinoids of soybean. Tetrahedron Lett., Oxford, 34: 3127-3128, 1978.
- LYNE, R.L.; MULHEIRN, L.J.; LEWORTHY, D.P. New pterocarpinoid phytoalexins of soybean. J. Chem. Soc. Chem. Comm., London, 497-498, 1976.
- LYON, G.D. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XXI. Extraction of a heat-labile elicitor of phytoalexin accumulation from frozen soybean stems. Plant Physiol., Lancaster, 70: 406-409, 1982.
- MANSFIELD, J.W. The role of phytoalexins in disease resistance. In: BAILEY, J.A. and MANSFIELD, J.W., ed. Phytoalexins. Glasgow, Blackie & Son Ltd., 1982, p.253-288.

- MANSFIELD, J.W.; HARGREAVES, J.A.; BOYLE, F.C. Phytoalexin production by live cells in broad bean leaves infected with *Botrytis cinerea*. Nature, London, 252: 316-317, nov. 1974.
- MAYAMA, S.; TANI, T.; UENO, T.; MIDLAND, S.L.; SIMS, J.J.; KEEN, N.T. The purification of victorin and its phytoalexin elicitor activity in oat leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol., London, 29: 1-18, 1986.
- MAYAMA, S.; TANI, T.; UENO, T.; HIRABAYASHI, K.; NAKASHIMA, T.; FUKAMI, H.; MIZUNO, Y.; IRIE, H. Isolation and structure elucidation of genuine oat phytoalexin, avenalumin I. Tetrahedron Lett., Oxford, 22: 2103-2106, 1981.
- MOESTA, P. & GRISEBACH, H. L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid inhibits phytoalexin accumulation in soybean with concomitant loss of resistance against *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Physiol. Plant Pathol., London, 21: 65-70, 1982.
- MÜLLER, K.O. & BÖRGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. Arb. Biol. Reichsanst. Land-und Forstw., Berlin, 23: 189-231, 1940.
- NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington, 84: 5520-5524, ago. 1987.
- NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPS-KIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. Physiol. Mol. Plant Pathol., London, 33: 271-278, 1988.

- OSSOWSKI, P.; PILOTTI, A.; GAREGG, P.J.; LINDBERG, B. Synthesis of a glucoheptaose and a glucooctaose that elicit phytoalexin accumulation in soybean. J. Biol. Chem., Baltimore, 259(18): 11.337-11.340, set., 1984.
- PAXTON, J.D. Phytoalexins - a working redefinition. Phytopath. Z., Berlin, 101: 106-109, 1981.
- PERRIN, D.R. The structure of phaseolin. Tetrahedron Lett., Oxford, 1: 29-35, 1964.
- PERRIN, D.R. & BOTTOMLEY, W. Studies on phytoalexins. V. The structure of pisatin from *Pisum sativum* L. J. Am. Chem. Soc., Washington, 84(10): 1919-1922, maio 1962.
- PETERSON, E.A. Cellulosic ion exchangers. In: WORK, T.S. and WORK, E., ed. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1975. Vol. 2, p.223-396.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS, INC: Sephadex ion exchanger - a guide to ion exchange chromatography. Uppsala, Sweden, 1970. 47p.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS, INC. Affinity chromatography - principles and methods. Uppsala, Sweden, 1974. 71p.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS, INC. Gel filtration - theory and practice. Uppsala, Sweden, 1979. 64p.
- PUEPPKE, S.G. Some intriguing aspects of the putative role of isoflavonoid phytoalexins in plant disease. Mycopathologia, Hague, 65: 115-119, 1978.

- RATHMELL, W.G. & BENDALL, D.S. Phenolic compounds in relation to phytoalexin biosynthesis in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant Pathol., London, 1: 351-362, 1971.
- SATO, N.; TOMIYAMA, K.; KATSUI, N.; MASAMUNE, T. Isolation of rishitin from tomato plants. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, Tokyo, 34(5): 344-345, dez. 1968.
- SHARP, J.K.; MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor - inactive hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. J. Biol. Chem., Baltimore, 259(18): 11.321-11.336, set. 1984a.
- SHARP, J.K.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. J. Biol. Chem., Baltimore, 259(18): 11.312-11.320, set., 1984b.
- SHARP, J.K.; ALBERSHEIM, P.; OSSOWSKI, P.; PILOTTI, A.; GARREGG, P.; LINDBERG, B. Comparison of the structures and elicitor activities of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitol. J. Biol. Chem., Baltimore, 259(18): 11.341-11.345, set., 1984c.
- SIMS, J.J.; KEEN, N.T.; HONWAD, V.K. Hydroxyphaseollin, an induced antifungal compound from soybeans. Phytochem., Oxford, 11: 827-828, 1972.
- SPIRO, R.G. Characterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: NEUFELD, E.F. and GINSBURG, V., ed. Complex carbohydrates, Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1966. vol. 8, p.26-52.

- SPIRO, R.G. Study of the carbohydrates of glycoproteins. In: GINSBURG, V., ed. Complex carbohydrates part B, Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1972. vol. 28, p.3-43.
- STAB, M.R. & EBEL, J. Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. Arch. Biochem. Biophysics, New York, 257(2): 416-423, set. 1987.
- STOESSL, A.; STOTHERS, J.B.; WARD, E.W.B. Sesquiterpenoids stress compounds of the solanaceae. Phytochem., Oxford, 15: 855-872, 1976.
- TEGTMEIER, K.J. & VANETTEN, H.D. The role of pisatin tolerance and degradation in the virulence of *Nectria haematococca* on peas: a genetic analysis. Phytopathol., St. Paul, 72(6): 608-612, jun. 1982.
- TEPPER, C.S. & ANDERSON, A.J. Two cultivars of bean display a differential response to extracellular components from *Colletotrichum lindemuthianum*. Physiol. Mol. Plant Pathol., London, 29: 411-420, 1986.
- TIETJEN, K.G.; HUNKLER, D.; MATERN, U. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 1. Identification of induced products as coumarin derivatives. Eur. J. Biochem., Berlin, 131(2): 401-407. 1983.
- VANDERPLANK, J.E. Other large molecules in relation to gene-for-gene disease. In: Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Berlin, Springer-Verlag, 1978. p.90-99.

- VANETTEN, H.D. & PUEPPKE, S.G. Isoflavonoid phytoalexins. In: FRIEND, J. and THRELFALL, ed. Biochemical aspects of plant-parasite relationships. London, Academic Press, 1976. p.239-289.
- VARNS, J.L.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Terpenoid accumulation as a biochemical response of the potato tuber to *Phytophthora infestans*. Phytopathol., St. Paul, 61: 174-177, fev. 1971.
- WEINSTEIN, L.I.; HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host--pathogen interactions. XVIII. Isolation and biological activity of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. Plant Physiol., Lancaster, 68: 358-363, 1981.
- YOSHIKAWA, M. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. Nature, London, 275: 546-547, out. 1978.
- YOSHIKAWA, M.; KEEN, N.T.; WANG, M.C. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. Plant Physiol., Lancaster, 73: 497-506, 1983.
- YOSHIKAWA, M.; YAMAUCHI, K.; MASAGO, H. Glyceollin: its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Physiol. Plant Pathol., London, 12: 73-82, 1978.
- ZIEGLER, E. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIII: Extracellular invertases secreted by three races of a plant pathogen are glycoproteins which possess different carbohydrate structures. Plant Physiol., Lancaster, 59: 1104-1110, 1977.

ZIEGLER, E. & PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan - elicited glyceollin accumulation in soybeans by an extra-cellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Physiol. Plant Pathol., London, 20: 321-331, 1982.